

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ÜLDISE- JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

Ants Tamme

**DExD/H-box valgu Irc3 kolmanda helikaasse motiivi muteerimise
mõju *Saccharomyces cerevisiae* mitokondriaalse DNA
stabiilsusele.**

Bakalaureusetöö

Juhendaja MSc Ilja Gaidutšik

TARTU 2013

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mudelorganismina.....	6
1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mitokonder	7
1.3. Mitokondriaalne DNA	10
1.4. Mitokondriaalsed <i>petite</i> mutandid	11
1.5. Mitokondriaalse DNA säilitamiseks vajalik valguline masinavärk.....	13
1.5.1. Irc3 on uus mitokondriaalse DNA säilitamise faktor	16
1.6. Helikaasid	16
1.6.1. Helikaaside olemus ja funktsioon.....	17
1.6.2. Helikaaside Superperekonnad 1 ja 2	17
1.6.3. DExD/H-box perekond.....	18
1.6.4. Helikaaside domeenid ja konserveerunud motiivid	20
2. EKSPERIMENTAALOSA	24
2.1. Töö eesmärk.....	24
2.2. Materjal ja meetodika	24
2.2.1. Töös kasutatud pärmi- ja bakteritüved ning söötmed.....	24
2.2.2. Töös kasutatud plasmiidid ja primerid	25
2.2.3. PCR preparatiivne ja analüütiline.....	26
2.2.4. Gelelektroforees ning DNA eraldamine geelist.....	27
2.2.5. Restriktsiooni- ja ligeerimisreaktsioonid.....	28
2.2.6. <i>E. coli</i> transformatsioon <i>Heat-Shock</i> meetodiga	28
2.2.7. Plasmiidse DNA eraldamine <i>E. coli</i> 'st.....	29
2.2.8. DNA fenooltöötlus	29
2.2.9. pRS315±400IRC3 SAT mut konstrukti valmistamine.....	30

2.2.10.	Transformatsioon Li-atsetaat (LioAc) meetodil	31
2.2.11.	Plasmiidi välja vahetamine 5-FOA süsteemiga	32
2.3.	Tulemused ja arutelu.....	33
2.3.1.	IRC3_SAT mut plasmiidi konstrueerimine.....	33
2.3.2.	<i>S.cerevisiae</i> w303a IRC3 SAT mut tüve transformatsioon.....	34
2.3.3.	Funktsionaalset IRC3 geeni sisaldava plasmiidi asendamine IRC3 SAT mut geeniga plasmiidi vastu	36
KOKKUVÕTE		41
RESÜMEE / SUMMARY		43
KIRJANDUSE LOETELU.....		44
LISAD		53
LISA 1.....		53
Lihtlitsents		55

KASUTATUD LÜHENDID

5-FOA – 5-fluorooroonhape

EtOH – etanool

mtDNA – mitokondriaalne DNA

ori – origin

ORF- *open reading frame*, avatud lugemisraam

p/min – pööret minutis

PEG – polüetüleenglükool

SF1/ SF2 – helikaaside superperekond I/II

SISSEJUHATUS

Pärmi hingamiseks on vaja funktsionaalset mitokondriaalset genoomi. Selleks, et genoom stabiilselt püsiks ja reprodutseeruks on vaja mitmeid tuumagenoomi poolt kodeeritud valke, mis moodustavad mitokondriaalse genoomi säilitamiseks vajaliku valgulise masinavärgi.

Üks nendest valkudest on IRC3 (süsteemaatilise nimetusega YDR332W) geeni poolt kodeeritud oletatav helikaas, mis kuulub helikaaside II superperekonnas oleva DExD/H valkude perekonda. Irc3 valgus on konserveerunud struktuursed motiivid, mis on iseloomulikud superperekonna 2 (SF2) DEAH helikaaside jaoks.

Iga konserveerunud struktuurne motiiv osaleb erinevates helikaasi tööga seotud protsessides: näiteks NTP sidumises ja/või hüdrolüüsis või substraadi (DNA:DNA, RNA:RNA või RNA:DNA) dupleksid ning muud struktuurid) sidumises ja lahtikeerumises ning/või antud protsesside koordineerimises. SF2 helikaaside III motiiv, mis kujutab endast Ser-Ala-Thr (SAT) aminohapete järjestust, osaleb helikaaside ATPaasete omaduste ja nukleiinhapete lahtikeeramise ja seondumise võimete ühendamises.

Käesoleva töö eesmärgiks oli Irc3 valgu SAT motiivi mutatsiooni mõju uurimine mitokondriaalse DNA säilitamisele.

Selleks, asendatakse SAT motiivi esimene aminohape seriin (Ser) ja kolmas aminohape treoniin (Thr) aminohaptegaalaniin (Ala). Sellise modifikatsiooni tulemusel muutub SAT motiiv mittefunktsioneerivaks AAA motiiviks ning analüüsitakse sellise mutatsiooniga tüve võimet säilitada mitokondriaalset DNA'd.

Töö autor tänab oma juhendajat Ilja Gaidutšikut kannatliku ning põhjaliku juhendamise eest ning kõiki teisi kolleege meeldiva seltskonna eest.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. *Saccharomyces cerevisiae* mudelorganismina

Saccharomyces cerevisiae ehk pagaripärm on laialt kasutatav mudelorganism rakubioloogia, raku metabolismi, rakutsükli ning signaali ülekande uurimisel. Kuna paljud regulatoorsed rajad on pärmis ja inimese vahel konserveerunud, võimaldab see uurida haiguste arenemisega seotud radu (Petranovic jt., 2010).

Eelisteks pärmis kasutamisel mudelorganismina võib pidada järgmisi tegureid (Gershon ja Gershon, 2000):

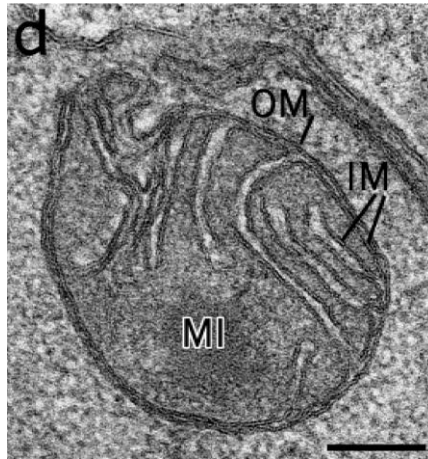
- suhteliselt lihtsa ja lühikese elutsükliliga üherakuline euraküootne organism;
- genoomis kodeeritakse umbes 6000 geeni (Goffeau jt., 1996);
- tal on lai kasvutingimuste spekter ning teda on kerge kultiveerida ja suurtes kogustes suhteliselt odav kasvatada;
- ei ole patogeenne;
- kergesti manipuleeritav (kasvatades erinevates tingimustes või muutes nukleotiidset järjestust);
- väga mitmekülgne DNA transformatsiooni süsteem (Gietz ja Woods, 2002);
- esineb nii haploidse kui ka diploidse vormina.

1996. aastal sekveneeriti täielikult *S. cerevisiae* genoom, see tegi temast esimese eukarüootse organismi, kelle genoomijärjestus täielikult teatavaks sai (Goffeau jt., 1996). Pärmis genoom on väga kompaktne, geenid moodustavad 72% kogu genoomist. Geeni keskmine suurus on ligikaudu 1,45 kb (Sherman, 2002).

S. cerevisiae on tänaseni kõige laialdasemalt uuritud mudelorganism mitokondriaalse genoomi säilitamist ja ekspressiooni puudutavates valdkondades (Szczesny jt., 2013).

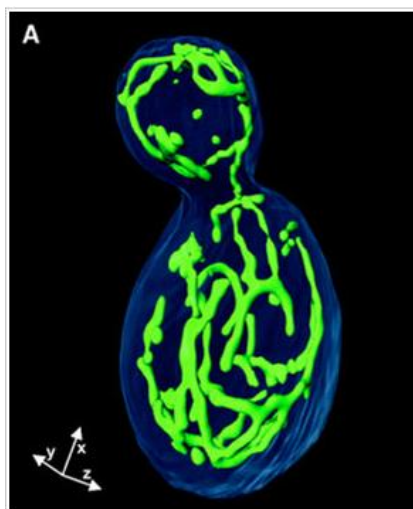
1.2. *Saccharomyces cerevisiae* mitokonder

Mitokondrid on eukarüootsetele rakkudele iseloomulikud kahe membraaniga ümbritsetud pooliseseisvad organellid (joonis 1), millel on enda genoom.



Joonis 1. *S. cerevisiae* mitokondri elektronmikrofoto. OM-välismembraan, IM-sisemembraan (Bauer jt., 2001).

Vastupidiselt mitokondrite kujutamisele ovaalsete struktuuridena, paljudes õpikutes, on nad tegelikult dünaamilised organellid, mis omavahel sulanduvad ja lahknevad. Selliste protsesside tulemusel moodustub, enamikus eukarüootsetes rakkudes, pidevalt muutuv torujas võrgustik (joonis 2). Mitokondriaalse võrgustiku dünaamilisuse regulatsioon on raku funktsionaalsuse tagamiseks äärmiselt suure tähtsusega (Hales, 2010).



Joonis 2. Kolmemõõtmeline rekonstruktsioon *S. cerevisiae* raku mitokondriaalsest võrgustikust (roheline) (Westermann, 2002).

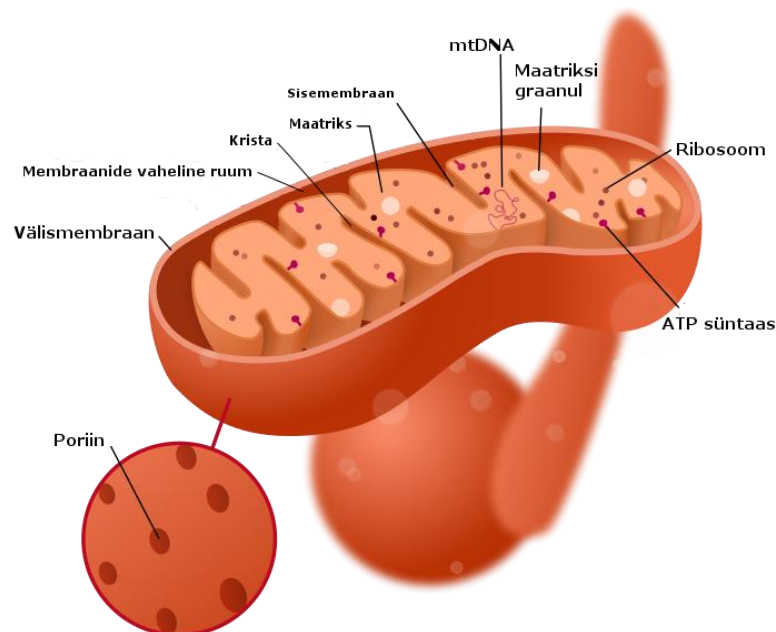
Mitokondriaalne võrgustik võimaldab spetsiaalsete mitokondriaalsete komponentide võrdset jaotumist üle võrgustiku. See stabiliseerib mitokondri funktsionaalsust ning täiustab organelli kui tervikut. Juhul kui kahe erineva defektiga mitokondriaalsed genoomid satuvad ühe organelli (ühe võrgustiku) sisse, saavad mõlemad kodeeridaprodukte, mida teine ei suuda. Selliselt tagatakse kõigi vajalike komponentide olemasolu ja mitokondri funktsionaalsus (Hales, 2010).

Mitokondrid võivad hõlmata väga suure osa raku tsütoplasma ruumalast. Ainult raku hingamise tingimustes (etanoolil) kasvanud punguvates rakkudes on 20-30 pisikest mitokondrit. Seejuures glükoosil kasvatatud rakud, mis hingavad nii õhku kui ka fermenteerivad, sisaldavad väikest arvu suuri hargnenud mitokondreid. Kusjuures selline morfoloogiline erinevus ei oma silmapaistvat mõju mitokondrite hõlmatud ruumala ja rakuruumala suhtele (Visser jt., 1995).

Kuigi mitokondreid seostatakse kõige enam just raku elutegevuseks vajaliku energia tootmisega (aeroobsetes tingimustes kasvavates eukarüootides) on neil veel mitmeid tähtsaid funktsioone. Mitokondritel on oluline roll rakutsükli ja rakujagunemise kontrollis ning signaaliülekannetes aga ka aminohapete, lipiidide ja raua metabolismis ning raku apoptoosil. On leitud, et mitokondrid on raku suurim Ca^{2+} hoidla (McBride jt., 2006; Lill ja Kispal, 2000; Newmeyer ja Ferguson-Miller, 2003).

Mitokondri membraanid moodustuvad valkudest ja fosfolipiidist kaksikkihist. Fosfolipiidid koosnevad hüdrofiilsest peast ning kahest hüdrofoobsest sabast. Enamiku mitokondri lipiidsetest komponentidest moodustavad fosfatidüülkoliin ~45%, fosfatidüületanolamiin ~30%, fosfatidüülinositool ~10% ning kardioliin ~10%. Umbes 45% mitokondris leiduvatest fosfolipiididest toodab mitokondrid iseseisvalt (Meer jt., 2008; Fujiki jt., 1982).

Mitokondrit ümbritsevate membraanide omavaheline paiknemine võimaldab mitokondri jaotumise viieks eraldiseisvaks osaks: välismembraan, sisemembraan, membraanide vaheline ruum, maatriks (sisemembraani sisse jääv ala) ja kristad (sisemembraani sissesopistused) (joonis 3).



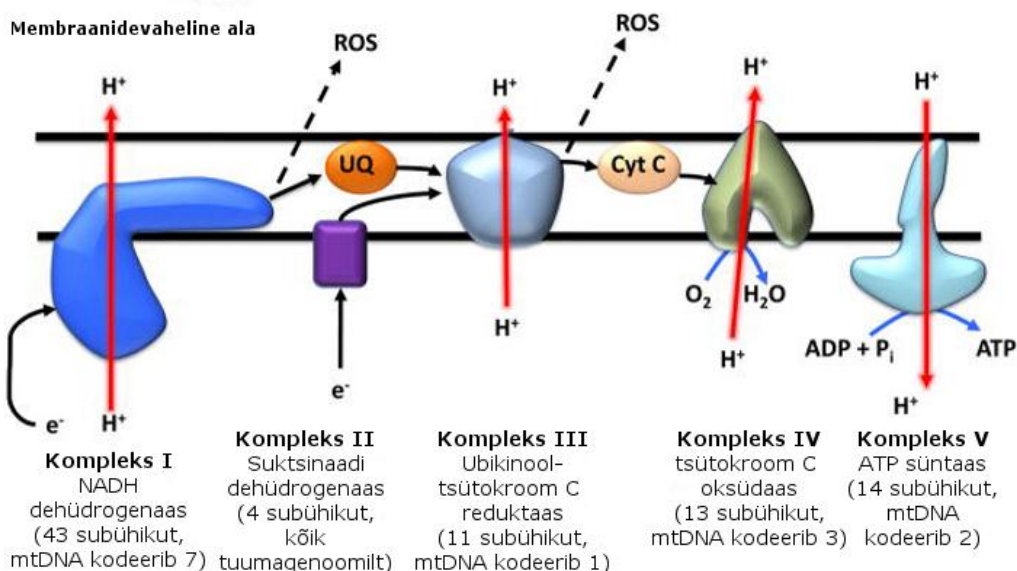
Joonis 3. Mitokondri jaotumine erinevateks osadeks.

Mitokondri välismembraani valkudel on oluline roll kommunikatsioonis tsütosooliga ning metaboliitide vahetuses. Kõik sisemembraanile suunatud valgud, mis on kodeeritud tuuma genoomil, peavad läbima välismembraani translokaasi kompleksi (TOM). TOM'i peavad läbima ka välismembraani koostisesse suunatud valgud (Becker jt., 2009).

Mitokondri sisemembraan on üks valgurikkamaid bioloogilisi membraane. Valkude osakaal moodustab mitokondri sisemembraani massist on 60-70%. Mitokondri sisemembraanis paiknevad ATP süntaas, hingamisahela kompleksi komponendid, eelvalkude translokaasi kompleks, mitmed metaboliitide kandjad, ABC-transporterid (*ATP binding cassette transporters*) ning AAA-proteasid (*ATPase associated with various cellular activities*). Enamik mitokondri sisemembraani valkudest on kodeeritud rakutuuma genoomilt ning seejärel mitokondrisse transporditud (Becker jt., 2009).

Keemilise energia tootmine (ATP kujul) toimub oksüdatiivse fosforüülimise käigus mitokondri sisemembraanil asuvate ATP süntaaside vahendusel. Oksüdatiivseks fosforüleerimiseks vajalik aparaat (elektronide transpordi ahel) (joonis 4) koosneb rohkem kui 80 erinevast valgust ning neist 13-14 kodeeritakse mitokondriaalselt DNA'lt (mtDNA)

(Smeitink jt., 2001). MtDNA kodeerib mitokondriaalse translatsiooni masinavärgi komponente ning ligikaudu 15% mitokondriaalsetest valkudest (Sherman, 2002). Mitokondri sisemembraanis paiknevatel hingamisahela kompleksidel on tähtis roll prootongradiendi moodustumisel mitokondri sisemembraani ja intermembraanse ruumi vahel. Tekkinud prootoni gradiendina akumulieeritud energia ja membraanipotentsiaali arvel käivitub ATP süntaas, mille töö tulemusel toimub ATP süntees.



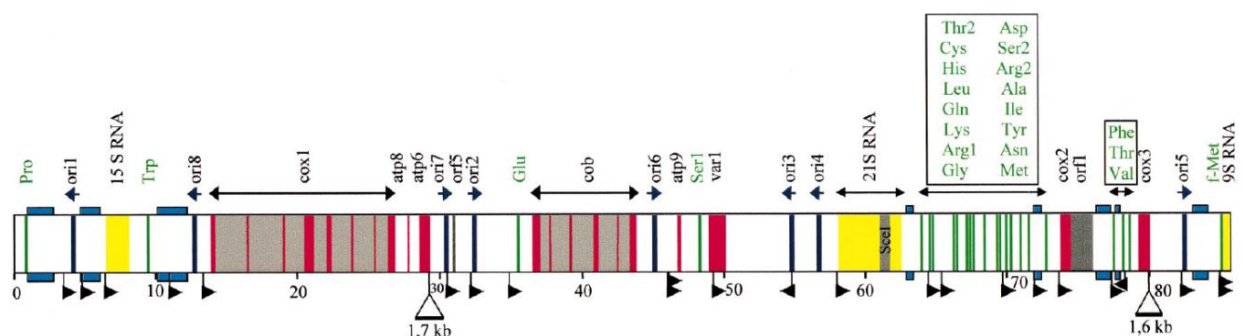
Joonis 4. Lihtsustatud mitokondriaalne elektronide transpordiahel. Erinevatesse kompleksidesse kuuluvate mtDNA'lt kodeeritud alaühikute hulk on näidatud joonisel. Kõik kompleksid, välja arvatud kompleks II, sisaldavad mtDNA'lt ja tuumagenoomilt kodeeritud valke. Mustad nooled - e^- liikumine mööda ahelat, punased nooled - H^+ liikumist läbi sisemembraani, punkteeritud nooled - elektronide lekkimisest tekkinud reaktiivsete hapnikuühendite (ROS – *reactive oxygen species*) teket (Ghouleh, 2011, Smeitink, 2001). Töö autor kombineeris joonistel kujutatud info.

1.3. Mitokondriaalne DNA

Mitokondril on oma genoom kuid ta vajab selle replitseerumiseks ja säilimiseks valke, millest enamik kodeeritakse tuuma genoomilt. Pärmi mtDNA on enamjaolt lineaarne, kuid sisaldab mõningal määral ka tsirkulaarseid molekule. Kuna pärmi mtDNA replikatsiooni *ori*'d sisaldavad promootorjärjestusi, siis peetakse üheks võimalikuks mtDNA replikatsiooni initsiatsiooni mehhanismiks inimorganismis toimuva RNA praimerisünteesiga analoogset süsteemi (Baldacci jt., 1984). MtDNA on pakitud nukleoidideks, mis on sisuliselt valgu ja DNA kompleksid (Chen ja Butow, 2005).

Mitokondriaalsete nukleoidide suurus ning arv varieeruvad sõltuvalt rakkude kasvukeskkonnast. Aeroobsetes tingimustes kasvanud rakkudes on, üle tsütoplasma hajutatult, umbes 60 mitokondriaalset nukleoidi, diameetriga 0,2 kuni 0,4 µm. Anaeroobsetes tingimustes kasvatatud rakkudes esinevad aga ülisuured mitokondriaalsed nukleoidid. Nende arv rakus on palju väiksem, keskmiselt 7,6 nukleoidi raku kohta. Seejuures on nende mõõtmed tunduvalt suuremad (0,6 kuni 0,9 µm) (Shiiba, 1996). Aeroobsetes rakkudes sisaldab üks nukleoid 1-2 koopiat mtDNA-d ja anaeroobsetes kuni 20 koopiat mtDNA-d (Miyakava jt., 1987). Ühe diploidse kromosoomistikuga *S. cerevisiae* rakus varieerub mtDNA arv vahemikus 8 – 130 koopiat, keskmiselt 50 koopiat raku kohta (Sherman, 2002).

Pärmi mitokondriaalne genoom hõlmab tsütokroom c oksüdaasi alaühikute I, II ja III (*cox1*, *cox2* ja *cox3*), ATP süntaasi alaühikute 6, 8 ja 9 (*atp6*, *atp8* ja *atp9*), apotsütokroom b (*cytb*), ribosomaalse valgu (*var1*) ja mitmete intron-seoseliste avatud lugemisraamide (*ORF*) geene (joonis 5) (Tzagoloff ja Mayers, 1986; de Zamaroczy ja Bernardi, 1986). MtDNA sisaldab ka seitset kuni kaheksat replikatsiooni *origin*-laadset elementi ning kodeerib 21S ja 15S ribosomaalseid RNA'sid, 24 tRNA'sid, mis tunnevad ära kõiki koodoneid, ning RNAas P 9S subühikut (de Zamaroczy ja Bernardi, 1986).



Joonis 5. *S. cerevisiae* tüve FY1679 lineariseeritud genoomikaart. Punane – eksonid ja valke kodeerivad geenid; hall – intronid või intronitega seotud ORF'id; roheline – tRNA; kollane – 9S, 15S ja 21S RNA; tumesinine – *ori*'d; lipud – transkriptsiooni initsiatsiooni saidid ja nende orientatsioon; suured kolmnurgad – suured deletatsioonid (Foury, 1998).

1.4. Mitokondriaalsed *petite* mutandid

Tavaliselt põhjustab hingamise täielik blokeerimine kemikaalidega või O₂ eemaldamine kasvukeskkonnast enamikule eukarüootsetele organismidele surma. Samuti on surmavate tagajärgedega defektid mtDNA's või tuumagenoomi piirkondades, mis kodeerivad

mitokondrile hädavajalike komponente. Kontrastina eelnevale on pärmid hästi tuntud kui fakultatiivsed anaeroobid. Pärmid suudavad kasvada, ilma hingamata, kääritatavaid substraate sisaldavatel süsinikuallikatel. See on ka põhjuseks, miks *S. cerevisiae* on väga sobiv mitokondrite biogeneesi analüüsimiseks (Shiiba, 1996).

Kuna MtDNA on otseselt seotud oksüdatiivse fosforüleerimise aparaadi alaühikute kodeerimisega (joonis 4) ja kõik mtDNA-lt sünteesitud oksüdatiivse fosforüleerimise aparaadi komponendid (elektronide transpordiahelasse kuuluvad kompleksid ja ATP süntaas) on hädavajalikud, siis sellest lähtuvalt peab olema tagatud mtDNA säilitamine ning vigadeta pärandamine. See on äärmiselt vajalik respiratoorsete funktsioonide säilimiseks raku kasvu ja arengu käigus.

Pärmi mitokondriaalse süsteemi omapäraks on niinimetatud tsütoplasmaalsete *petite* mutantide esinemine. Sellised mutandid avastati rohkem kui 50 aastat tagasi (Ephrussi, 1955). Metsiktüüpi ning erinevate *petite* mutantide eristamiseks töötati välja vastav süsteem, mille alusel oleks võimalik iseloomustada pärmirakkude tüüpi.

Pärmirakkude mtDNA tüübi iseloomustamisel lähtutakse funktsionaalse mtDNA esinemisest ning seda hinnatakse rho [ρ] faktoriga. Selles süsteemis jaotatakse pärmirakud vastavalt mtDNA tüübile rho⁺ [ρ^+] ning *Petite* mutandid rho⁻ [ρ^-] ja rho⁰ [ρ^0].

Pärmirakkude üldiseloomustus vastavalt ρ faktorile on järgmine:

- rho⁺ – metsiktüüpi pärmirakud, hingavad normaalselt ja moodustavad suuri kolooniaid;
- rho⁻ – rakkudel on säilinud väike osa mtDNA'st (koosneb metsiktüüpi genoomi fragmentidest). Tavaliselt sisaldab see mtDNA mitmetes kordustes replikatsiooni *origin* järjestusi;
- rho⁰ – mutantidel puudub mtDNA täielikult.

Rho⁻ ja rho⁰ mutandid on kaotanud raku hingamise võime, kuid saavad kasvada söötmel, mis sisaldab fermenteeritavat süsinikuallikat. Sellistel tingimustel kasvades moodustuvad *petite* kolooniad on väikesed kuna saavad energiat vaid anaeroobsest glükolüüsist (Williamson, 2002; Lipinski, 2009). Deletsioonid tuumagenoomi geenides, mis kodeerivad mtDNA metabolismiga seotud valke, põhjustavad täieliku mtDNA kadumise ning muudavad metsiktüüpi rho⁺ pärmitüve rho⁰ tüveks, mille mitokondrites puudub igasugune DNA (Lipinski, 2010).

1.5. Mitokondriaalse DNA säilitamiseks vajalik valguline masinavärk

Lisaks RNA ja DNA polümeraaside aktiivsusele on mtDNA säilitamiseks ja ekspresseerimiseks vajalik mitmete teiste valkude olemasolu. Erinevatest organismidest on kokku teada ligikaudu 30 valku, mis on identifitseeritud tõenäoliste mitokondriaalsete nukleoidide komponentidena.

Mõnede valkude funktsioon mtDNA pärandumises on teada ning sellest lähtuvalt oletatakse ka nende valkude leidumist mitokondriaalsetes nukleoidides (tabel 1). Näiteks pärmi Abf2 (*abscisic acid responsive elements-binding factor 2*) kuulub HMG (*High Mobility Group*) valkude gruppi ja vastutab otseselt DNA pakkimise eest (Kaufman jt., 2000; Chen ja Butow, 2005).

Üllatavalt on erinevate proteoomiliste analüüside tulemusel avastatud grupp valke, mille teadaolevad funktsioonid ei ole seotud mtDNA säilitamisega. Nende avastuste põhjal oletatakse, et mitokondritel on arenenud eriline süsteem, mis kasutab samaaegselt mitokondri metabolismis osalevaid valke, oma genoomide organiseerimiseks ja säilitamiseks. Näiteks krebsi tsükli ensüüm mitokondriaalne akonitaas Aco1, mis konverteerib tsitraati isotsitraadiks, on vajalik ka mtDNA stabiliseerimiseks (Chen ja Butow, 2005).

Tabel 1. MtDNA säilumisega seotud valgud ja nende funktsioonid (Kaufman jt., 2000; Chen ja Butow, 2005).

mtDNA säilitamisega seotud valk	valgu funktsioon	allikad
Abf2	DNA sidumine, painutamine ja pakkimine	Diffley ja Stillman, 1991; Diffley ja Stillman, 1992
Rim1	mtDNA replikatsioon, ssDNA'd siduv valk	Van jt., 1992
Mgm101	DNA sidumine, paljundamine ja reparatsioon	Chen jt., 1993; Meeusen jt., 1999
Hsp60	Mitokondriaalse nukleoidi segregatsioon	Kaufman jt., 2000
Ilv5	Aminohapete biosüntees, mtDNA stabiliseerimine	Zelenya –Troitskaya jt., 1995

Aco1	Akonitaas, mtDNA säilitamine	Chen jt., 2005
Irc3	Oletatav RNA helikaas	Alvaro jt., 2007
Mip1	DNA polümeraas, mtDNA replikatsioon	Ropp ja Copeland; 1995; Foury 1989
Mhr1	rekombinaas	Ling jt., 1995; Ling ja Shibata, 2002
Mrh4	RNA helikaas	Schmidt jt., 2002
Cce1	resolvaas	Zweifel ja Fangman, 1991; Kleff jt., 1992; Lockshon jt., 1995
Exo5	ssDNA 5'-eksonukleas	Burgers jt., 1988; Burgers jt., 2010
Hmi1	3'-3' DNA helikaas	Lee jt., 1999; Sedman jt., 2000; Kuusk jt., 2005; Sedman jt., 2005
Pif1	5'-3' DNA helikaas	Foury ja Lahaye, 1987; Lahaye jt., 1991
Rpo41	RNA polümeraas	Greenleaf jt., 1986; Kelly ja Lehman 1986
Mss116	Mittepolaarne RNA helikaas,	Halls jt., 2007
Mtf1	Rpo41 spetsiifilisusfaktor/sigmafaktor	Schinkel jt., 1987; Mangus jt., 1994
Cdc9	ligaas	Willer jt., 1999; Donahue jt., 2001
Msh1	<i>mismatch</i> reparatsioon	Reenan ja Kolodner, 1992;
Suv3	RNA helikaas, mitokondri degradosoomi komponent	Dziembowski jt., 2003; Turk ja Caprara, 2010

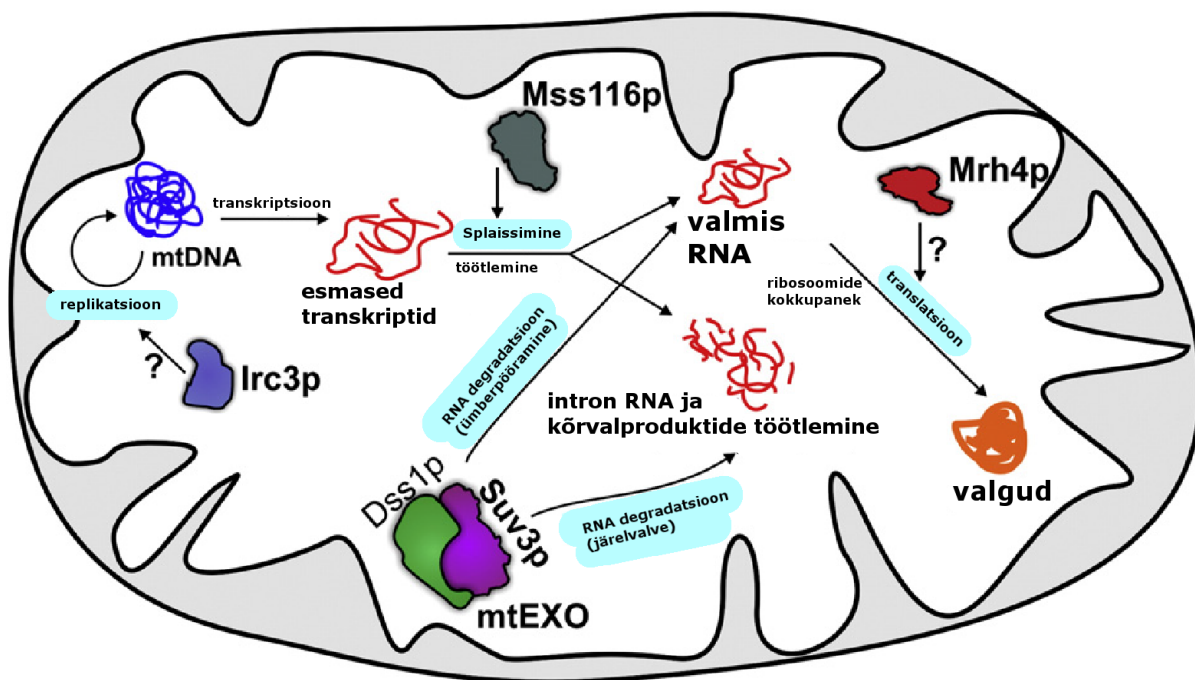
MtDNA säilitamiseks on vajalikud ka osa otseselt DNA replikatsiooniga seotud valke. Sellisteks valkudeks on Mip1, Rim1 ja Rpo41-Mtf1 kompleks. Mip1 on mtDNA polümeraasi katalüütiline subühik (Foury, 1989). Rim1 (*replication in mitochondria*) on Mip1 supressorvalk, mis seostub üheaheelalise DNA-ga ning on vajalik mtDNA säilimiseks (van Dyck jt., 1992). Rpo41 on mitokondriaalse RNA polümeraasi katalüütiline subühik, mis mõjutab mtDNA stabiilsust, olles mtDNA replikatsioonil DNA ahela sünteesi initsiaatoriks. Lisaks omab see valk mtDNA stabiilsusele kaudset mõju, mõjutades mitokondriaalset valgusünteesi. Rpo41 puudumisel kasvavad üles *petite* rakud (Fangman, 1990). Mtf1 on

vajalik spetsiifilisusfaktor transkriptsiooni läbiviimiseks (Schinkel jt., 1989; Mangus jt., 1994).

Lisaks replikatsiooniga seotud valkudele on vaja mtDNA säilitamiseks rekombinatsioonis ja reparatsioonis osalevaid valke. Pif1 (*Petite Integration Frequency*) on DNA rekombinatsiooni ja reparatsiooniga seotud mtDNA helikaas. Hmi1 on oluline ρ^+ genoomi stabiilsust tagav helikaas, kuid selle puudumisel säilib siiski ρ^- genoom (Sedman jt., 2005). Ka Mgm101 on seotud mtDNA säilimisega, osaledes mtDNA reparatsioonis. Mgm101 mutandid on tundlikumad UV- ja gammakiirgusele ning H_2O_2 -le (Meeusen jt., 1999).

S. cerevisiae tuumagenoomilt kodeeritakse veel nelja SF2 DExH/D perekonda kuuluvat valku (Mss116, Suv3, Mrh4, Irc3), mis käituvad helikaasidena ja/või RNA *chaperon*'idena ning nende aktiivsus on vajalik mtRNA splaissimiseks, lagundamiseks, translatsiooniks ja genoomi säilitamiseks (Szczesny jt., 2013).

Mss116, Suv3, Mrh4 ja Irc3 sisaldavad tüüpilist SF2 NTP-sõltuva helikaasi tuuma, mis koosneb kahest RecA-sarnasest domeenist (Fairman-Williams jt., 2010; Rocak ja Linder, 2004; Tanner ja Linder, 2001; Linder, 2006; Jankowsky ja Fairman 2007). Mss116p ja Mrh4p sisaldavad üldtunnustatud DEAD tetrapeptiide, Irc3 kuulub DExD/H perekonda ning Suv3p sisaldab ebatavalist järjestust DEIQ varianti DExH/D motiivist. Kõik neli valku osalevad mitokondri geneetilise süsteemi funktsioneerimise tagamises (joonis 6) (Szczesny jt., 2013).



Joonis 6. RNA helikaaside funktsioonid *S. cerevisiae* mitokondriaalses geeniekspressioonis. Helesinisel taustal on kujutatud protsessid, milles oletatakse RNA helikaaside osalemist. Suures rasvases kirjas on valkude ja komplekside nimed, mille puhul on näidatud või oletatud RNA helikaasset aktiivsust. Kõrvalmärgid tähistavad oletatavaid funktsioone, mis baseeruvad piiratud arvu eksperimentaalsetel tõenditel. Kompleksid, mis ei sisalda RNA helikaasi valke on selguse mõttes jooniselt eemaldatud (Szczesny jt., 2013).

1.5.1. Irc3 on uus mitokondriaalse DNA säilitamise faktor

Irc3, mida kodeerib YDR332W ORF, on mitokondriaalne valk, mille järjestus sisaldab SF2 NTP-sõltuvat helikaasituuma koos DEAH tetrapeptiididega II motiivis. Kuigi Irc3 omab II motiivis DEAH perekonna järjestust, sarnaneb ta üldine aminohappeline järjestus rohkem DEAD perekonnaga. Seepärast kuulubki oletatav Irc3 helikaas DEAD/DEAH ehk DExD/H-box perekonda (de la Cruz jt., 1999; Szczesny jt., 2013; Alvaro jt., 2007).

Irc3 mitokondriaalne lokalisatsioon ennustati *in silico* tööriistadega ja on kinnitatud suuremahuliste eksperimentaalsete analüüsidega (Huh jt., 2003). Ülegenoomsed fenotüübilised analüüsid ennustavad Irc3'le põhiliselt mitokondriaalseid funktsioone kuigi funktsiooni ja lokalisatsiooni ka väljaspool mitokondrit ei saa hetkel välistada (Merz ja Westermann, 2009).

Eksperimentaalsed andmed Irc3 rollist mitokondris on hetkel väga napid ning killustatud. Mõningate eeltööde põhjal võib oletada, et Irc3 ei osale mtRNA metabolismis (Szczesny jt., 2013).

IRC3 geeni deletsioon fermetneeritaval süsinikuallikal (glükoosil) kasvavatel w303 *S.cerevisiae* pärimüvedel põhjustab järsu metsiktüübi mtDNA kadumist jäädes mittefunktsioneerivaid ρ^- genoome. Kasvades mittefermenteeritaval süsinikuallikal (glütseroolil) $\Delta irc3$ tüved suudavad aga oma respiratoorset võimet (ja funktsionaalset mtDNA-d) säilitada. Antud vaatlus viitab sellele, et Irc3 valgu põhiline roll võiks olla mitokondriaalse genoomi stabiilsuse säilitamine (Biokeemia labor, publitseerimata andmed; Szczesny jt, 2013).

1.6. Helikaasid

1.6.1. Helikaaside olemus ja funktsioon

DNA ja RNA helikaasid on ensüümid, mille oletatavaks funktsiooniks peetakse energeetiliselt stabiilse kaheaheelalise DNA (dsDNA) ja RNA (dsRNA) molekulide lahtikeerdumist NTP (tavaliselt ATP) hüdroolüüsi protsessidest saadava energia arvel (Tanner ja Linder, 2001; Tuteja ja Tuteja, 2004). Seetõttu on helikaasidel oluline roll peaaegu kõigis DNA metabolismiga seotud toimingutes.

Helikaaside esinemine prokarüootides, eukarüootides ja viirustes kinnitab nende vundamentaalsust DNA ja RNA metaboliitiliste protsesside läbiviimisel, sealhulgas replikatsioon, rekombinatsioon, DNA parandamine, transkriptsioon, translatsioon ja RNA splaissimine (Schmid ja Linder, 1992; Matson jt., 1994). Eelmainitud protsesside ja helikaaside vaheline seos lubab eeldada, et helikaasidel on oluline roll ka mtDNA säilitamisel.

1.6.2. Helikaaside Superperekonnad 1 ja 2

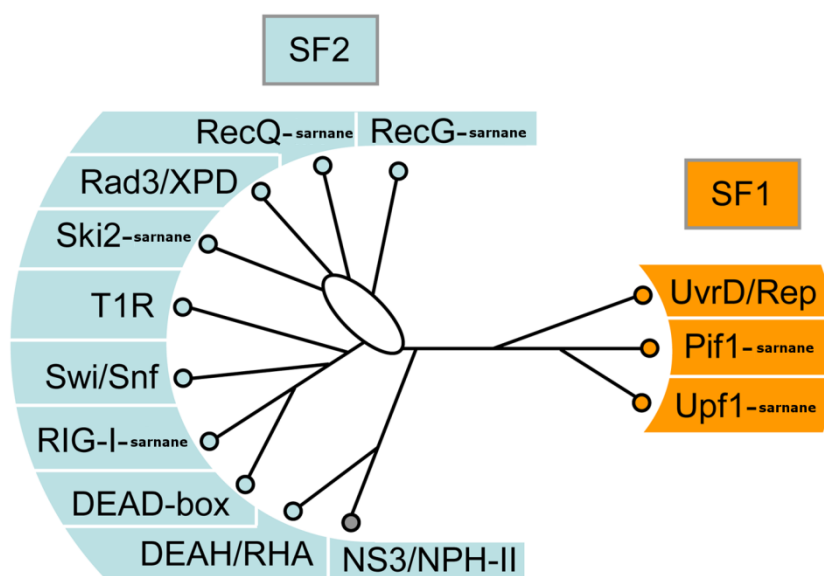
Helikaasid on jaotatud erinevatesse superperekondadesse vastavalt helikaasides konserveerunud motiivide arvule ning nende motiivide konsensusjärjestustele, mis esinevad rohkem kui ühes perekonnas (Gorbalenya ja Koonin, 1993; Caruthers ja McKay, 2002).

SF1 ja SF2 perekonda kuuluvad monomeersed helikaasid, millel on vähemalt 7 konserveerunud järjestuste motiivi (joonis 7). Need perekonnad on enim uuritud ning kõige lähedasemalt omavahel seotud. Oma liikmete arvude järgi on nad kõige suuremad superperekonnad (Hall ja Matson, 1999).

SF1 ja SF2 perekondadesse kuuluvate helikaaside katalüütilised tuumad on voltunud peaaegu identselt ning neil esinevad laiaulatuslikud struktuurilised sarnasused. Igas perekonnas on struktuurse konserveerituse tase veelgi suurem (Singleton jt., 2007; Jankowsky ja Fairman, 2007). Vaatamata sellele täidavad iga perekonna erinevad helikaasid laia valikut funktsioone mitmesugustel substraatidel, ulatudes kromosomaalsest DNA'st ribosoomi

prekursori ja väikeste mittekodeerivate RNA'deni (Lohman jt., 2008; Linder ja Owtrim, 2009; Strunk ja Karbstein, 2009).

Klassikaline helikaaside aktiivsus, milleks on ATP energia arvel kaksikahelate lahtikeeramine, ei ole alati SF1 ja SF2 perekonna helikaaside primaarne füsioloogiline funktsioon (Lohman jt., 2008; Jankowsky ja Fairman, 2007; Mayas ja Staley, 2006; Jankowsky ja Bowers, 2006).



Joonis 7. Skeemil on kujutatud (vasakul) SF2'te kuuluvad 9 perekonda ja 1 grupp ning (paremal) SF1'te kuuluvad 3 identifitseeritud perekonda. Perekondade identifitseerimisel kombineeriti inimese, *S. cerevisiae*, *E. coli* ja valitud viiruste SF1 ning SF2 perekonna kõikide valkude järjestamise fülogeneetilist analüüsi ning hinnati eraldiseisvate järjestuste tunnuste ja domeenide organisatoorseste karakteristikute olemasolu ning puudumist. Puu okste pikkus ei ole kasutatav skaalana. Ovaal kujutab märkimisväärset ebakindlust selles puu regioonis. Perekonnad nimetati vastavalt kasutuses olevatele nimedele või vastavalt perekonna silmapaistvatele liikmetele. Perekonnad mis on oma nime saanud ühest valgust lähtuvalt on nimetatud „sarnane“. Ebastandardised lühendid on kajastatud järgmiselt: T1R – tüüp 1 restriksiooni ensüümid; RHA – RNA helikaas A (Fairman-Williams 2010).

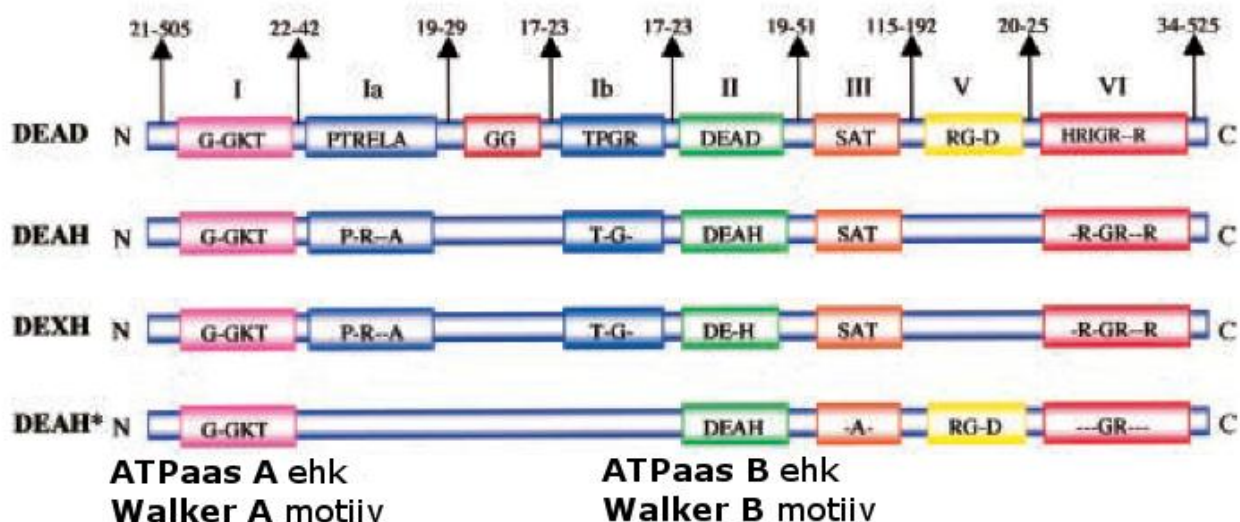
1.6.3. DExD/H-box perekond

DExH/D-box perekond kuulub SF2'te. DExD/H helikaaside perekonna liikmeid on leitud peaaegu kõigist organismidest. Nad osalevad paljudes erinevates bioloogilistes protsessides, kaasaarvatud transkriptsioon, DNA parandamine, pre-rRNA töötlemine ja splaissimine.

DExD/H-*box* on perekondade rühm, mis koondab mitmeid perekondi, kus esinevad DExD/H aminohappelisele järjestusele vastavad motiivid („x“ tähendab, et selles positsioonis võib esineda ükskõik milline aminohape), sellesse gruppi kuuluvad kõik DEAD-*box*, DEAH-*box* ja Ski2 perekonna valgud (de la Cruz jt., 1999).

Vastavalt II motiivis (Walker B motiiv) konserveerunud aminohapete järjestuste variatsioonidele jagatakse SF2 perekonna helikaasid erinevatesse gruppidesse: DEAD, DEAH, DExH ja DEAH* (Tuteja ja Tuteja, 2004) (joonis 8).

Superperekond 2 (SF2)



Joonis 8. SF2 perekonna DEAD-*box* valkude konserveerunud motiivide I ja II organisatsioon ning variatsioonid. DEAD-, DEAH- ja DEXH-*box* valgud kuuluvad peamiselt RNA helikaaside hulka, kuid neid motiive on täheldatud ka mõnel DNA helikaasil. DEAH*-*box* valkude variatsioon on suurim ning neil on DNA helikaasne aktiivsus. Numbrid noolte kohal tähistavad konserveerunud domeenide vahelist kaugust (Tuteja ja Tuteja, 2004).

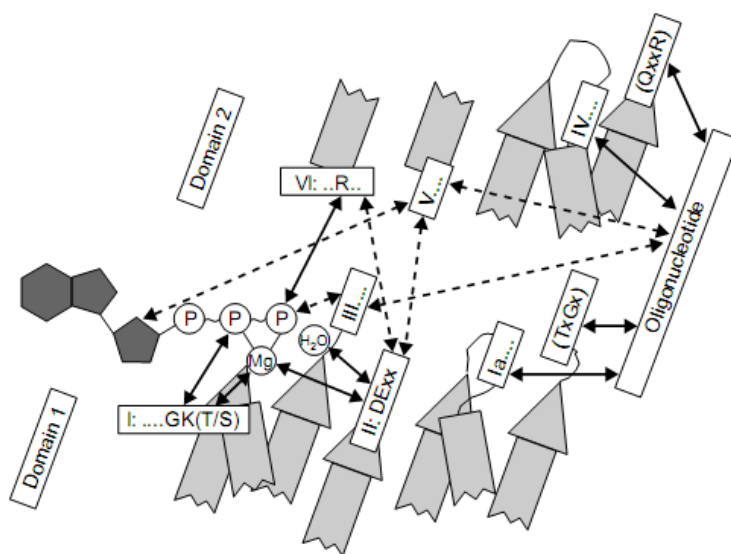
Kuigi SF2'te kuuluvat DEAD-*box* valkude perekonda peetakse peamiselt RNA helikaaside perekonnaks on leitud hulgaliselt tõendeid selle kohta, et DEAD-*box* perekonna valgud täidavad küll rakus mitmeid funktsioone, kuid osad neist ei vaja selleks RNA helikaasest aktiivsust (de la Cruz jt, 1999; Cordin jt, 2005; Linder, 2006; Fuller-Pace, 2006). Kui mõned DEXH valgud kasutavad valimatult kõiki NTP'sid, siis DEAD-*box* valgud kasutavad RNA ja valkude ümberkujundamiseks ATP hüdrolyüsist saadavat energiat (Rocak jt., 2005).

Mitmete DExD/H-*box* valkudega (näiteks pärmi valgud eIf4a, Ded1p, Prp2p, Prp16p, Prp22p) on näidanud motiivide I (AxxGxGKT), II (DExH/D), III (S/TAT) ja VI

(Q/HRxGRxGR) konserveerunud aminohappeliste järjestuste tähtsust *in vivo* funktsioonide ja *in vitro* ATPaasi aktiivsuse ja nukleiinhapete kaksikahelate lahtiharutamiseks (Pause jt., 1993; Gross ja Shuman, 1998; Iost jt., 1999; Pause ja Sonenberg, 1992; EdWalds-Gilbert jt., 2000; Schneider jt., 2002; Heilek ja Peterson, 1997; Blum jt., 1992; Schmid ja Linder, 1991).

1.6.4. Helikaaside domeenid ja konserveerunud motiivid

Helikaaside kolmedimensiooniliste kristallstruktuuride uuringud on näidanud, et kõigi helikaaside konserveerunud järjestused on klasterdunud. Selle tulemusel moodustuvad nukleotiidide seondumiseks vajalik tasku ning nukleiinhappe seondumise sait (Joonis 9). Helikaasidele on iseloomulikud nukleiinhapete sidumine, NTP/dNTP sidumine ja hüdrolüüsimine ning sellest hüdrolüüsist sõltuvalt kaheahelaliste nukleiinhapete 3' → 5' või 5' → 3' suunaline lahti keeramine (Hall ja Matson, 1999).

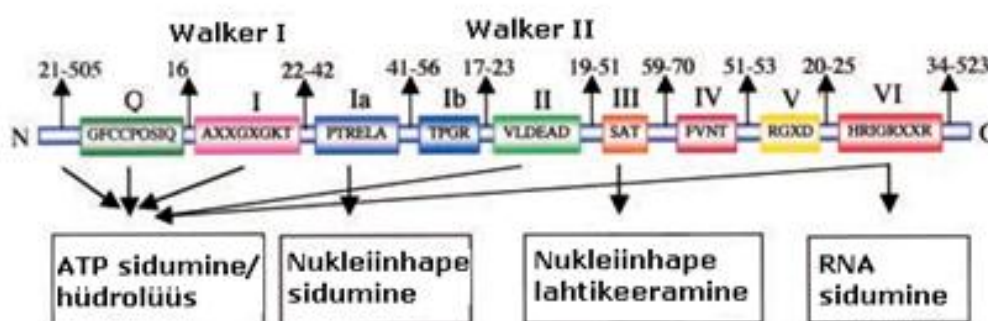


Joonis 9. Skemaatiline joonis, mis kirjeldab konserveerunud motiivide suhteid ATP-ga ja oligonukleotiidiga ning motiivide omavahelisi suhteid SF-1 ja SF-2 superperekondades. Pidevate joontega on kujutatud interaktsioonid, mis on tõestatud kristallstruktuuridega ja mutageneesi katsetega. Punktiirjoontega on kujutatud interaktsioonid, mida näidati mõnede valkude puhul. Need võivad olla spetsiifilised mingitele valkude perekondadele. (Caruthers ja McKay, 2002).

Selliseid domeene võib võrrelda mootorina, mis kasutab ATP-d kütusena. Mootor toodab energiat, mida saab kasutada töö tegemiseks, antud juhul piki DNA/ RNA ahelat liikumiseks või hoopis DNA või RNA dupleksi lahtikeerumiseks (Hall ja Matson, 1999).

Sellisel funktsioneerimiseks peab niinimetatud mootor interakteeruma nii NTP-ga kui ka nukleiinhaptega. Seejuures peab ta olema võimeline hüdrolüüsima NTP-d ning suutma hüdrolüüsist saadud energiat kasutada nukleiinhappe lahtikeeramiseks (Hall ja Matson, 1999).

Helikaaside iseloomulikuks tunnuseks on kõrgelt konserveerunud aminohapete järjestuste ehk helikaasi motiivide esinemine (joonis 10). Kuna selliseid motiive on leitud suurtest helikaaside gruppidest arvatakse, et helikaaside geenid on edasi arenenud ühistest eellastest (Tuteja 2004). Oletatakse, et motiivid on helikaasi funktsioneerimise seisukohalt kriitilise tähtsusega (Hall, 1999). ~



Joonis 10. DEAD-box helikaaside perekonna konserveerunud motiivid, funktsioonid ja organisatsioon (Tuteja ja Tuteja, 2004).

Kõigil motiividel on oma funktsioon ja roll selleks, et helikaas saaks toimida ühtse funktsionaalse üksusena.

Q motiiv

Q motiiv on hiljuti avastatud unikaalne ja DEAD-box perekonna valkudele, välja arvatud DEAH valgud, iseloomulik motiiv (Tanner jt, 2003). See motiiv koosneb 9 aminohappelisest järjestusest, milles omab kesksel rollil üks kõrgelt konserveerunud glutamiin (Q). Q motiiv asub I motiivist 15-22 aminohapet eespool. Pärms on sellel motiivil oluline roll eluvõime säilitamisel kuna osaleb ATP sidumisel ja hüdrolüüsil (Tanner, 2003).

Motiiv I ja Ia

Motiiv I ehk Walker A on ATPaasi A motiiv. SF1 perekonnas on sel motiivil RNA helikaasi konsensusjärjestus AXXGXGKT. SF2 perekonnas aga GXXXXXGKT, mis on

ATPaasi, GTPaasi ja mõnede DNA helikaaside konsensusjärjestuseks (X'ga märgitud järjestuse asukohtades võib asuda ükskõik milline aminohape) (Gorbalenya jt., 1989). On näidatud, et järjestuse GKT kõrgelt konserveerunud osas on olulisel kohal lüsiin (K), mis seostub ATP molekulis fosfaadiga. ATPaas-mutantsetel valkudel puudub helikaasne aktiivsus. Sellest võib järeldada, et nukleinhappe duplexi lahti harutamiseks on ATPaasne aktiivsus vajalik (Pause ja Sonenberg, 1992; Hall ja Matson, 1999). Motiiv Ia osaleb ssDNA sidumises (Tuteja ja Tuteja, 2004).

Motiiv II

Motiiv II ehk Walker B on ATPaasi B motiiv. Seda motiivi sisaldavaid valke kutsutakse DEAD-*box* valkudeks (Linder jt., 1989). DEAD motiivis on kõrgelt konserveerunud DE järjestus, mis on omane paljudele DNA ja RNA replikatsioonis osalevatele valkudele (Gorbalenya jt., 1989). Konserveerunud järjestuses DE on oluline aspartaathape (D), mis on vajalik ATP sidumiseks. Mutatsioonid DE järjestuses mõjutavad valgu ATPaasset ja helikaasset aktiivsust.

Motiiv III

Kuigi selle motiivi funktsioonist ei ole seni täielikult aru saadud, viitab interaktsioonide võrgustik III motiivi aminohappejääkide ning ATP, ssDNA ja 2. domeeni vahel sellele, et III motiiv on suuteline omavahel siduma ATPaasset aktiivsust ja nukleinhapete lahtikeerdumise võimet.

Motiivi III muteerimine (SAT→AAA) ei mõjuta oluliselt ATPaasset aktiivsust, kuid põhjustab helikaasse aktiivsuse kadumist eIF4A valgul, mis on DEAD-box RNA helikaas (Rocak jt., 2005; Pause ja Sonenberg; 1992; Graves-Woodward jt., 1997). Sellest lähtuvalt oletati, et ära kaob ATPaasi ja nukleinhapete lahtikeeramise vaheline seos. Sama mutatsiooni teostamisel Dbp8 valgus muutus pärmirakkudele omaseks aeglane kasv 30 °C (Daugeron ja Linder, 2001).

Uemate, Ded1 valguga teostatud, eksperimentaalsete katsete tulemustele toetudes võib väita, et III motiivi roll on keerulisem kui lihtsalt helikaasse ja ATPaasse aktiivsuse omavaheline sidumine. Leiti, et III motiivi mutandid talusid *in vivo* tingimusi vaevaliselt, mõjutasid ATP hüdrolyüsi ning ssRNA'ga seondumise afiinsust ja omadusi. Afiinsus ATP suhtes jäi aga muutumatuks. Sellest lähtuvalt vähenes kaheaheelaliste nukleinhapete lahti

harutamise kiirus. Ded1 valgu puhul on näidatud III motiivi olulist rolli *in vivo* aktiivsuses (Banroques jt., 2010).

Kuigi erinevate SF2 valkude III motiivide muteerimise uurimisel *in vivo* ja *in vitro* on täheldatud märkimisväärsed lahknevusi, on siiski leitud ühiseid seaduspärasusi. Mõlema alkoholi asendamisel (alkohol-alaniin-alkohol ehk S/T-A-S/T järjestuses) ilmnesid külmatundlikus ja aeglane kasv või mitteelujõuline fenotüüp. Samuti on näidatud, et kolmandas positsioonis konserveerunud alkohol on kriitilisema tähtsusega kui esimeses positsioonis konserveerunud alkohol. Mutatsioon mõjutas ATPaasi ja mööda nukleiinhappe ahelat liikumise aktiivsust. ATP seondumise afiinsusel oli vähem märgatav efekt (Banroques jt., 2010).

Motiivid IV, V ja VI

Rep ja PcrA valgu motiiv IV seostub ensüüm-ADP kompleksis otseselt nukleotiidiga. Rep valgu motiiv V kontakteerub otse seotud oligonukleotiidiga (Tuteja ja Tuteja, 2004). Mutatsioonid motiivi konserveerunud järjestuses vähendavad ensüümi afiinsust ssDNA-le ning hüdrolyüsi taset (Hall ja Matson, 1999). Konserveerunud aminohapete muutused motiivis VI kaotavad valgu võime siduda RNA-d ja vähendavad ATP hüdrolyüsi, mille tulemusel väheneb helikaasne aktiivsus. Arvatavasti on motiiv VI vajalik helikaasi liikumiseks mööda DNA substraati (Pause ja Sonenberg, 1992; Tuteja ja Tuteja, 2004).

Konserveerunud motiivid võib jagada põhimõtteliselt kolmeks. Sellised, mis seovad ja hüdrolyüsivad MgATP/MgADP. Sellised, mis osalevad otseselt või kaudselt oligonukleotiidide sidumises ning sellised motiivid, mis ühendavad ATPaasse reaktsiooni ja intramolekulaarsed muutused. Näiteks nukleiinhappe dupleksi lahtikeeramine. Konserveerunud motiivid on head helikaaside tunnusmärgid, mida kasutatakse uute helikaaside ja ATPaaside tuvastamiseks *in silico*.

Mutatsioonid konserveerunud motiivides mõjutavad helikaaside aktiivsust (Hall ja Matson, 1999).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärk

- Käesoleva töö eesmärgiks oli Irc3 valgu kolmanda helikaasse motiivi mutatsiooni mõju uurimine mitokondriaalse DNA säilitamisele.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Töös kasutatud pärmi- ja bakteritüved ning söötmed

Töös kasutatud pärmitüved:

S. cerevisiae irc3:Hph ja w303 α genotüübiga: can1-100, leu2-3,-112, his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, ade2-1. *S. cerevisiae* tüvi irc3:Hph oli Ilja Gaidutšiku valmistatud.

Töös kasutatud bakteritüved:

E. coli tüvi DH5 α ; genotüüp: [F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169, hsdR17(r_K- m_K⁺), λ -] (Hanahan, 1983).

Töös kasutatud söötmed.

Bakteritüve DH5 α rakud kasvatati 37° C juures LB söötmes (1% baktotrüpton, 0,5% bakto-pärmiekstrakt, 0,5% NaCl pH 7) või 2xYT söötmes (1,6% trüpton; 1% pärmiekstrakt; 0,5% NaCl). LB tardsöötmele lisati 1,7% agarit. Õigete kolooniate selekteerimiseks kasutati ampitsiliini lõppkontsentratsiooniga 100 μ g/ml.

Pärmitüvede kasvatamiseks kasutatud söötmed:

YPG:1% pärmiekstrakt; 2% baktotrüptoon; 3% glütserool.

Synthetic Complete (SC) -Ura sööde: 2% glükoos; 0,67% ilma aminohapeteta YNB; 0,2% aminohapete ja nukleosiidide segu ilma uratsiilita; 1,7% agar.

Tüvede kasvatamiseks SC-Ura vedelsöötmes, valmistati sööde ilma agarita.

SC-Ura-Leu sööde: 2% glükoos; 0,67% ilma aminohapeteta YNB; 0,2% aminohapete ja nukleosiidide segu ilma leutsiini ja uratsiilita; 1,7% agar.

SC-Leu: 2% glükoos; 0,67% ilma aminohapeteta pärmilämmastialust (YNB); 0,2% aminohapete ja nukleosiidide segu ilma leutsiinita; 1,7% agar.

Tüvede kasvatamiseks SC-Leu vedelsöötmes, valmistati sööde ilma agarita.

SC-Leu FOA selektiivne sööde: 0,1% FOA; 2% glükoos; 0,67% ilma aminohapeteta YNB; 0,2% aminohapete ja nukleosiidide segu ilma leutsiinita; 1,7% agar (Boeke jt., 1987).

Tööde teostamiseks kasutati Applichemi kemikaale.

2.2.2. Töös kasutatud plasmiidid ja primerid

Tabel 2. Töös kasutatud plasmiidid

Plasmidi nimetus	Kirjeldus	Eesmärk
pRS315	(pBLUESCRIPT KS+ +LEU2, CEN6, ARSH4) (Skiroski ja Hieter, 1989)	Puna-valge testis negatiivne kontroll
pRS315±400 IRC3	IRC3 genoomne järjestus ±400 ap	Puna-valge testis positiivne kontroll
pRS315±400 IRC3 SAT mut	IRC3 genoomne järjestus ±400 ap mutatsiooniga III motiivis SAT; S190A, T192A	Puna-valge testis katse läbiviimine
pRS 316±400 IRC3	IRC3 genoomne järjestus ±400 ap	Puna-valge testis positiivne kontroll
pRS315±400 IRC3 GKT mut	IRC3 genoomne järjestus ±400 ap mutatsiooniga I motiivis GKT; K65A	Puna-valge testis võrdlus

Tabel 3. Töös kasutatud praimerid.

Praimer	Järjestus 5'→3'	Positsioon IRC3 geenil
Konstruktide valmistamine ja plasmiidide kontroll		
IRC3_3_1097	GTGAACGCGATTTTGTGGGCCTAC	1097nt
IRC3_SAT_mut	GGCTTTGCTGCGGCTTTCGAAAG	561 IRC3 geenil
IRC3BamHI5	GCC GGATCC CTTGGAGACTTACCGCAAAAACAAT	406nt ülesvoolu
RSP	CAGGAAACAGCTATGAC	540nt ülesvoolu

**Bold*'is tähistatud restriктаaside lõikekohad, restriksiooniks sobiv ensüüm on mainitud praimeri nimetuses.

2.2.3. PCR preparatiivne ja analüütiline

Kõik PCR reaktsioonid viidi läbi Eppendorf PCR'i masinas Mastercycler personal või Biometra PCR'i masinas T1 Thermocycler.

Megapraimeri konstrueerimiseks ja amplifitseerimiseks tehti 50µl PCR reaktsioonisegu, mis sisaldas järgmisi komponente: 1x Taq puhver, 2,5 mM MgCl, 0,2 mM dNTP, praimerit IRC3_SAT_mut 0,4 pmol/µl; praimerit IRC3_3_1097 0,4 pmol/µl; matriitsina kasutati plasmidi pRS315±400 IRC3 0,2 ng/µl; 0,05 U/µl Pfu (Naxo) polümeraasi; Reaktsioonisegu viidi õige ruumalani kasutades MQ dH₂O'd.

PCR programm: kuum stardiga esimene kuumutamine 95°C 180 sek, seejärel 29x DNA denatureerimine 95°C 30 sek, praimerite kinnitumine 55°C 30 sek, DNA süntees 72°C 60 sek. Viimases tsüklis, kus toimus DNA otste lõplik süntees, hoiti 72°C 300 sek. Pärast seda jahtutati segu 10 °C'ni.

Inserdi konstrueerimiseks ja amplifitseerimiseks tehti 50µl PCR reaktsioonisegu, mis sisaldas järgmisi komponente: 1x PCR puhver (750 mM Tris-HCl, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1%

TritonX, pH8,8), 2,5 mM MgCl, 0,2 mM dNTP, eelnevalt amplifitseeritud megapraimerit 200 ng; praimerit IRC3BamHI5 1 pmol/μl; matriitsina kasutati plasmidi pRS315±400 IRC3 0,6 ng/μl; 0,05 U/μl. Taq/Pfu polümeraaside (Naxo) segu suhtes 1:4; Reaktsioonisegu viidi õige ruumalani kasutades MQ dH₂O'd.

PCR programmi kuum stardiga esimene kuumutamine 95°C 300 sek, seejärel 29x DNA denatureerimine 95°C 60 sek, praimerite kinnitumine 58°C 60 sek, DNA süntees 72°C 150 sek. Viimases tsüklis, kus toimus DNA otste lõplik süntees, hoiti 72°C 300 sek. Pärast seda jahtutati segu 10 °C'ni.

Analüütiline PCR viidi läbi, et kontrollida *E. coli* DH5α kloneerimise õnnestumist. Reaktsioon teostati 10 μl's reaktsioonisegus, mis koosnes järgmistest komponentidest: 1x *Yellow* puhver puhver (750 mM Tris-HCl, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% TritonX, 5% Ficoll 400, 10 mM Tartrazine, pH8,8), 2,5 mM MgCl, 0,2 mM dNTP, 0,125 U/μl Taq (Naxo) polümeraasi, praimerit IRC3_3_1097 0,25 pmol/μl; praimerit RSP 0,25 pmol/μl; matriitsina kasutati transformeeritud bakterikolooniaid. Reaktsioonisegu viidi õige ruumalani kasutades MQ dH₂O'd.

PCR programmi kuum stardiga esimene kuumutamine 95°C 180 sek, seejärel 29x DNA denatureerimine 95°C 30 sek, praimerite kinnitumine 55°C 30 sek, DNA süntees 72°C 105 sek. Viimases tsüklis, kus toimus DNA otste lõplik süntees, hoiti 72°C 1 sek. Pärast seda jahtutati segu 10 °C'ni.

PCR produkte kontrolliti 0,8 % agarosgeelis.

2.2.4. Geelelektroforees ning DNA eraldamine geelist

Restriksiooni- ning PCR produktid voolutati kontrollimise eesmärgil 0,8% agaros-TAE geelis. Geel sisaldas 0,8% agarosi, 40mM Tris-atsetaati, 2mM EDTA pH8,5 ja etiidumbromiidi 1 μg/ml. Etiidumbromiidi lisati DNA tuvastamiseks UV valguses. DNA geelile kandmiseks kasutati 6x TAE värvi (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 0,3% bromofenool *blue*; 60% glütserool; 60 mM EDTA). DNA suurusmarkerina kasutati MIX5'te, mis oli valmistatud Tiina Sedmani. DNA eraldamiseks geelist kasutati MO BIO Laboratories firma Ultra Clean Kit'i vastavalt firma poolt välja töötatud protokollile. Reaktsioonisegude tsentrifuugimiseks kasutati lauatsentrifuugi Eppendorf Mini Spin (rootor F45 12-11).

2.2.5. Restriktsiooni- ja ligeerimisreaktsioonid

pRS315±400 IRC3 mut plasmidi konstrueerimiseks ja analüütiliseks kontrollimiseks kasutati Fermentas restriktase, T4 DNA ligaasi ja puhvreid.

pRS315±400 IRC3 SAT mut plasmiid konstrueeriti plasmiidist pRS315±400 IRC3 ja inserdist IRC3 geenijärjestus, kuhu oli PCRi abil mutatsioon sisse viidud). Mõlemat DNA-d (1-1,5 µg) lõigati BamHI (0,65 U/µl) ja BstZ117I (0,35 U/µl) restriktaseidega 2x Tango puhvris 2 tundi 37°C juures, reaktsioonisegu maht viidi MQ dH₂O'ga 20 µl'ni. Restriktsiooniproduktid voolutati 0,8% agarosgeelis ning puhastati UltraClean™ 15 DNA purification Kit'i (Mo Bio Laboratories, Inc), vastavalt Kit'i protokollile.

Ligeerimise jaoks kasutati T4 DNA ligaasi ja 1x T4 DNA ligaasi puhvrit. Ligeerimisegu valmistati 10 µl-s ühe reaktsiooni kohta ning sisaldas 1x T4 DNA ligaasi puhvrit, 0,5 U T4 DNA ligaasi, 5% PEG4000, 100 ng inserti ning 60 ng restriktsiooni käigus avatud vektorit. Segu hoiti 1 tund toatemperatuuril, seejärel pandi 4 °C juurde.

Analüütiline restriktsioon teostati pRS315±400 IRC3 SAT mut kloneerimise kontrollimiseks. Plasmidi (1 µg) lõigati HindIII'ga (0,25 U/µl) 1x RED puhvris, reaktsioonisegu maht viidi MQ dH₂O'ga 20 µl'ni. Restriktsiooniproduktid voolutati 0,8% agarosgeelis ning UV valguses hinnati lõikunud fragmentide arvu ja suuruste õigsust.

2.2.6. *E. coli* transformatsioon *Heat-Shock* meetodiga

Transformatsiooni *E. coli*'sse kasutati ligeeritud plasmidi pRS315±400 IRC3 SAT mut paljundamiseks. Ühe transformatsiooni jaoks võeti 50 µl kompetentseid *E. coli* DH5α rakke ning inkubeeriti jääl 8 min. Lisati 3 µl ligeerimisegu ning hoiti 30 min jääl, aeg-ajalt segades. Seejärel tehti heat-shock 37 °C juures 2 min, misjärel lisati rakkudele 500 µl LB vedelsöödet, kuhu oli lisatud 40 µl 40% glükoosi ning 40 µl 1M MgSO₄. Seejärel inkubeeriti rakke 1h 37 °C. Peale seda tsentrifuugiti 5 min 5000 p/min Eppendorf Mini Spin tsentrifuugiga (rootor F45 12-11) rakud põhja, eemaldati üleliigne sööde (400 µl),

suspendeeriti rakud alles jäänud söötmes (153 µl) ning plaaditi ampitsilliini sisaldavale LB tardsöötmele.

2.2.7. Plasmiidse DNA eraldamine *E. coli*'st

Plasmiidi sisaldavatest bakterikolooniatest külvati rakke 2 ml LB söötmesse, millele oli lisatud 100 µg/ml ampitsilliini. Vedelkultuuri kasvatati loksutil üleöö 37 °C juures. Bakterirakud tsentrifuugiti põhja 15 sek min 13400 p/min Eppendorf Mini Spin tsentrifuugiga (rootor F45 12-11) (kõik järgnevad tsentrifuugimised tehti sama tsentrifuugiga), sööde eemaldati ja sade lahustati 200 µl SOL I's (50mM glükoos; 25mM Tris HCl pH8,0; 10mM EDTA), tehti vortex ning pandi jääle. Seejärel lisati 400 µl SOL II (0,2 M NaOH; 1% SDS) ja hoiti jääl 5 min. Pärast seda lisati 300 µl SOL III (5M kaaliumatsetaat; 11,5% äädikhape; MQ H₂O), keerati eppendorfi reaktsioonituubi mõned korrad ning inkubeeriti jääl 15 min. Seejärel tsentrifuugiti proovi 5 min 13400 p/min. Supernatant kanti uude tuubi ja lisati 0,6 mahtu isopropanooli, tehti kerge vortex, inkubeeriti toatemperatuuril paar minutit ning tsentrifuugiti 5 min 13400 p/min. Supernatant eemaldati pipetiga ning sadet pesti 80% EtOH-ga 5 min, tsentrifuugiti 5 min 13400 p/min ning eemaldati pesuetanool. Sade kuivatati lahtise korgiga ning lahustati 50 µl T₁₀E₁ + RNAasA's (20 µg/ml, pH 8,0). Tehti vortex, oodati 5 min, et sade lahusesse läheks ning inkubeeriti 65 °C peal 10 min.

2.2.8. DNA fenooltöötlus

DNA-d sisaldavale lahusele lisati sademe paremaks visualiseerimiseks 20 µg dekstraani. Seejärel viidi ruumala T₁₀E₁'ga 200 µl-ni ning lisati 80 µl fenool/kloroformi (Phe/Chl) segu (pH 7,5). Tehti vortex ning tsentrifuugiti Eppendorf Mini Spin tsentrifuugiga (rootor F45 12-11) 5 min 13400 p/min. Ülemine faas tõsteti uude tuubi ja lisati 1/10 mahust 3M naatriumatsetaati pH 7,0 ning 2,5 mahtu 96% EtOH. Segu inkubeeriti -20 °C 20 minutit ning sade tsentrifuugiti põhja 5 min 13400 p/min. Eemaldati supernatant ning sadet pesti 80% EtOH-ga. EtOH eemaldati ning sade lahustati 20 µl T₁₀E₁-s.

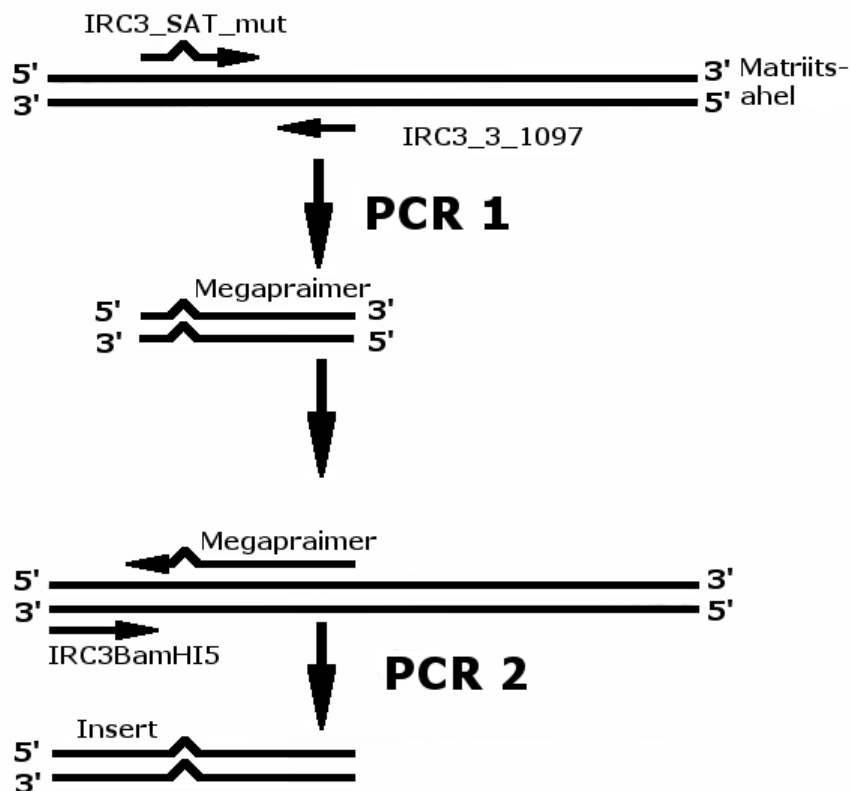
2.2.9. pRS315±400IRC3 SAT mut konstrukti valmistamine

Soovitud mutatsiooniga (S190A, T192A) inserdi saamiseks kasutati megapraimer punktmutageneesi meetodit (joonis 11) (Sarkar ja Sommer, 1990). Megapraimeri konstrueerimiseks ja amplifitseerimiseks kasutati PCR-i. Reaktsioon teostati pRS315±400IRC3 plasmidi ning Pfu (Naxo) polümeraasiga ja praimeritega IRC3_SAT_mut ning IRC3_3_1097. Pärast megapraimeri konstrueerimist kanti saadud PCR produktid agarosgeelile ning eraldati geelist õige pikkusega fragmendid, vastavalt MO BIO Laboratories firma Ultra Clean Kit'i firma poolt välja töötatud protokollile.

Inserdi valmistamine ja amplifitseerimine teostati samuti PCR'i abil. Selleks kasutati ühe praimerina eelnevalt konstrueeritud megapraimerit ning teise praimerina IRC3BamHI5. Reaktsioonisegus kasutati Taq/Pfu (Naxo) polümeraaside segu suhtes 1:4. Jällegi kontrolliti saadud fragmendi suurust agarosgeelil ning õige pikkusega fragment eraldati geelist vastavalt MO BIO Laboratories firma Ultra Clean Kit'i firma poolt välja töötatud protokollile.

Saadud inserdile tehti Phe/Chl töötlus ning seejärel teostati restriksioonireaktsioon BamHI ja BstZ17I (Fermentas) restriктаasidega, et tagada õige konformatsiooniga ahelate otsad.

Selliselt teostatud PCR'de ja restriksioonireaktsioonide tulemusel saadi insert, mis ligeeriti, pRS315±400IRC3 plasmidist BamHI ja BstZ17I restriктаasidega lõikamise tulemusel saadud, vektorisse. Saadud konstruti õigsust kontrolliti sekveneerimisega, mis teostati LOMRI tuumiklaboris.



Joonis 11. Megaprimer punktmutageneesi meetodi illustatsioon.

2.2.10. Transformatsioon Li-atsetaat (LioAc) meetodil

Transformatsiooniks kasutati *S. cerevisiae* tüve *w303a can1-100, leu2-3,-112, his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, ade2-1, irc3:Hph*, kus *irc3* geen oli eelnevalt antibiootikum *Hph* (*hygromycin*) geeniga asendatud. Antud tüve kolooniad kasvatati YPG söötmes 25 °C loksutil umbes OD₆₀₀ 0,4-ni. Seejärel tsentrifuugiti rakud 5 min 3500 p/min Hettich Universal 32R (rootor 1617 *swing out*) tsentrifuugiga põhja. Rakkudelt eemaldati sööde ja sadet pesti autoklaavitud MQ-H₂O-ga ning tehti vortex. Seejärel tsentrifuugiti rakke uuesti 5 min 3500 p/min ning eemaldati supernatant. Sama protseduuri korrati 500 µl 1x 0,1M LioAc/ T₁₀E₁-ga pH 7,5, kuid sel korral kasutati tsentrifuugimiseks Eppendorf Mini Spin (rootor F45 12-11). Rakud resuspendeeriti 50 µl-s 0,1M LioAc/ T₁₀E₁-s ning inkubeeriti rakukesta permeabeliseerimiseks 20 min 30 °C juures, aeg-ajalt loksutades. Seejärel lisati 10 µl *carrier* (lõhe sperma) DNA-d (10 µg/µl), mida oli eelnevalt denatureeritud 5 min 95 °C juures ja 5 min jääl hoitud ning 1 µg transformeeritavad plasmiidset DNA-d. Segu inkubeeriti 20 min 30 °C juures, lisati 0,3 ml 40% PEG 4000; 0,1M LioAc; 10 mM Tris pH7,5; 1 mM EDTA lahust.

Tehti vortex ning inkubeeriti 30 °C juures 30 minutit. Seejärel tehti kuumašokk 10 min 42 °C. Pärast seda tsentrifuugiti rakke 2 min 5000 p/min (Eppendorf Mini Spin; rootor F45 12-11) ja eemaldati supernatant. Selleks, et eemaldada võimalikult palju supernatanti, teostati tsentrifuugimist kaks korda. Rakud resuspendeeriti üles 150 µl autoklaavitud MQ-H₂O's ning plaaditi selektiivsöötmele (SC-Ura). Tassid asetati termostaati 30 °C juurde (Rose jt., 1990).

2.2.11. Plasmiidi välja vahetamine 5-FOA süsteemiga

5-FOA (fluorooroonhape) süsteemi kasutatakse URA3 geeni sisaldavate rakkude selekteerimiseks. URA3 geen kodeerib uratsiili biosünteesiks vajalikku ensüümi (orotidiin-5-fostaat dekarboksülaasi). Kui URA3 geeniga rakke kasvatada 5-FOA söötmel, kasutab orotidiin-5-fostaat dekarboksülaas uratsiili asemel substraadina 5-FOA-d, mille produkt, 5-fluorouratsiil, on rakkudele mürgine. 5-FOA'd sisaldaval söötmel jäävad ellu vaid need rakud, mis ise uratsiili ei sünteesi, järelikult need, millel pole URA3 geeni (Boeke jt., 1987).

Seda meetodit kasutatakse korraga mitut plasmiidi sisaldavate pärmitüvede puhul, kui tahetakse vabaneda URA3 markergeeni sisaldavast plasmiidist.

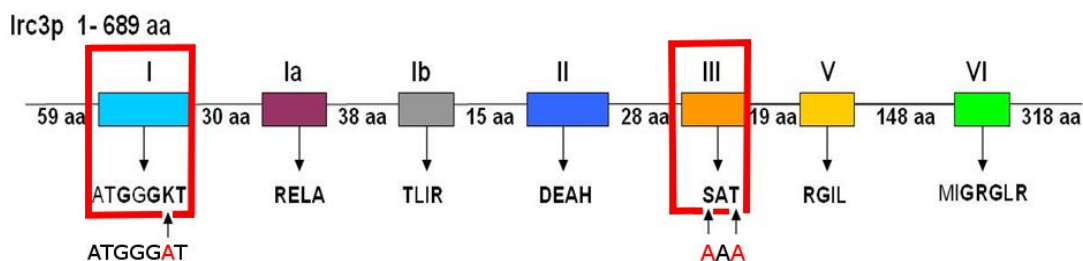
ADE2 mutatsiooni tulemusel moodustavad w303 tüve rakud fermenteeritaval süsinikuallikal funktsionaalse mtDNA-ga (ρ^+) suuri punaseid kolooniaid. Rakud, mille normaalne mitokondriaalne genoom on kaduma läinud, moodustavad valgeid *petite* kolooniaid. Kui ρ^+ rakud kaotavad jagunemise käigus oma funktsionaalse mtDNA, siis moodustuvad segatüüpi, punaste ja valgete sektoritega, kolooniad (Boeke jt., 1987).

Eelnevalt transformeeritud tüvede kolooniad külvati SC-Leu vedelsöötmesse ning kasvatati üleöö. Seejärel lahjendati kultuur sobiva tiheduseni ning külvati 5-FOA'd sisaldavale SC-Leu tardsöötmele.

2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. IRC3_SAT mut plasmidi konstrueerimine

Oletatava Irc3 helikaasi konserveerunud III motiivi (SAT) mõju uurimiseks, mtDNA stabiilsusele, oli vaja valmistada konstrukt, kus oleks nimetatud motiiv muteeritud. Muteerimiseks asendatakse SAT motiivi esimene aminohape seriin (Ser), positsioonis 190, ning kolmas aminohape threoniin (Thr), positsioonis 192,alaniiniga (Ala) (joonis 12).



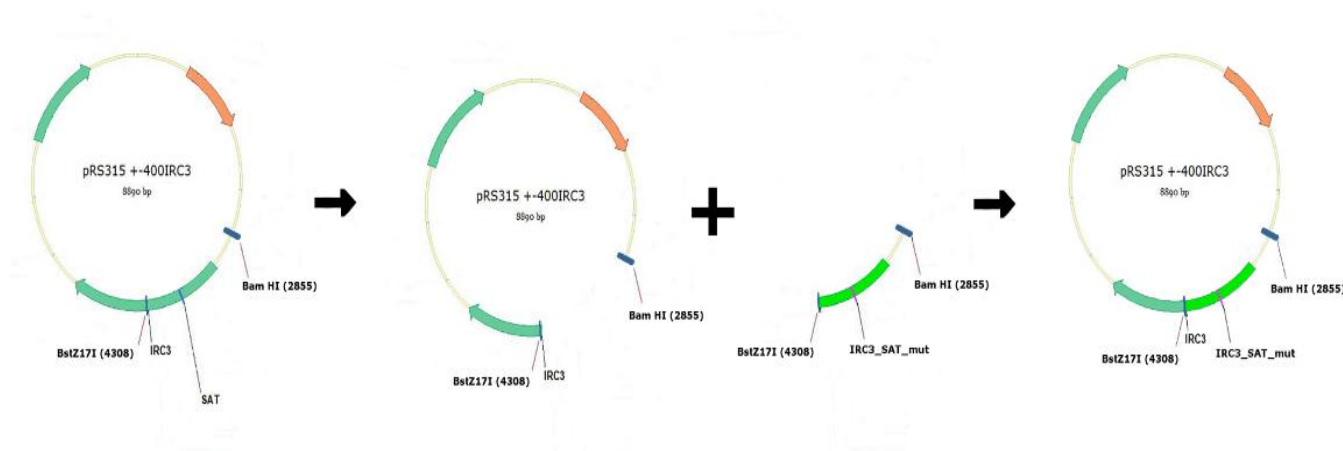
Joonis 12. Irc3 helikaasi motiivid ning teostatud mutatsioonid (joonis: Ilja Gaidutšik).

Mutantse geeniga plasmidi konstrueerimiseks kasutati eelnevalt Dmitri Lubenetsi poolt valmistatud pRS 315±400 IRC3 plasmidi. pRS315 on *shuttle* vektor mida on võimalik kasutada DNA propageerimiseks nii pärmis kui ka bakteris (Skiroski ja Hieter, 1989).

Plasmiidil pRS315 on madal koopiaarv, mis tähendab, et rakus on ligikaudu 10 nimetatud plasmidi koopiat. See võimaldab välistada, pRS315 plasmiidilt ekspresseeritava valgu üleekspressiooni.

Plasmiidis pRS315±400 IRC3 asendati restriksioonisaitide BamHI ja BstZ17I vahele jääv regioon fragmendiga IRC3_SAT mut, mis sisaldas soovitud mutatsiooni (joonis 13). Mutantsel fragmendil oli asendatud kaks nukleotiidi vastavas SAT motiivi järjestuses. Valgu aminohappelise SAT järjestuse muutmiseks AAA järjestuseks konstrueeriti mutageenne praimer. Selleks muudeti originaalpraimerit nukleiinhappeline järjestus GGCTTTAGTGCGACTTTCGAAAG vastavalt GGCTTTGCTGCGGCTTTCGAAAG'ks. Nimetatud mutatsioon viidi plasmidi megaprimer punktmutageneesi meetodil (Sarkar ja

Sommer, 1990). Konstrueeritud plasmiid transformeeriti *E. coli* DH5 α rakkudesse nagu on kirjeldatu materjal ja meetodid peatükis.



Joonis 13. Fragmenti IRC3_SAT mut sisaldava plasmidi pRS315 \pm 400 IRC3 SAT mut konstrueerimine.

Üles kasvanud *E. coli* DH5 α rakkudest valiti 30 kolooniat, milles kontrolliti IRC3 geeni olemasolu PCR abil. Selleks kasutati primereid IRC3_3_1097 ja RSP, mille abil amplifitseeriti 1621 ap pikkune DNA lõik, mis sisaldas 513 ap pikkust lõiku IRC3 geeni ees ning IRC3 geeni järjestusest 1076 ap.

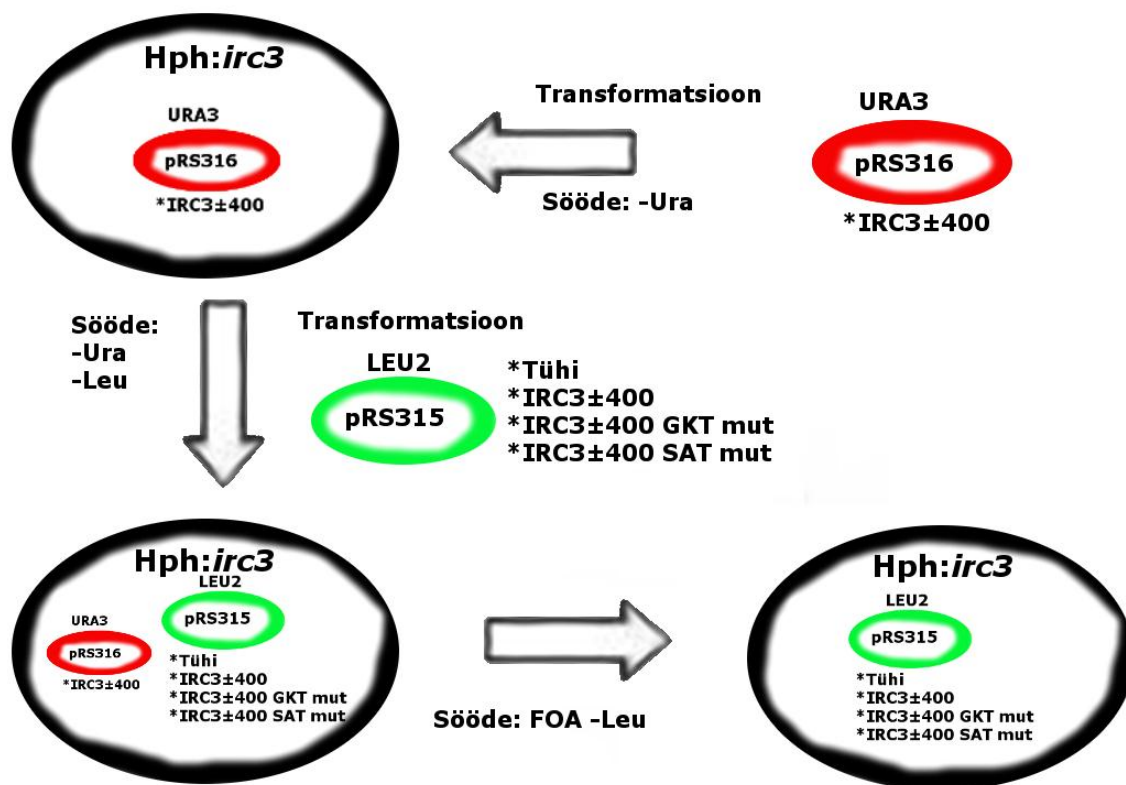
Kuna ainult üks koloonia andis positiivse tulemuse, siis eraldati sellest plasmiidne DNA, mille inserdi olemasolu kontrolliti restriksioonanalüüsi abil. Selleks lõigati uuritavat DNA-d restriктаasiga HindIII, mis lõikab konstrukti kolmest kohast, tekitades 6980 ap, 962 ap ja 948 ap pikkused fragmendid. Valmistatud konstrukti klonereimise õigsuse ning mutatsiooni olemasolu kontrollimiseks saadeti konstrukti LOMRI tuumiklaborisse sekveneerimisele. Sekveneerimine kinnitas mutatsiooni olemasolu.

2.3.2. *S.cerevisiae* w303a IRC3 SAT mut tüve transformatsioon

Irc3 mutandi mõju uurimiseks mtDNA stabiilsusele, kasutati pärmi tüve w303a *can1-100, leu2-3,-112, his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, ade2-1, irc3:Hph*, kus IRC3 geen oli asendatud antibiootikumi Hph (*hygromycin*) geeniga. Pärmi tüvesid kasvatati YPG söötmel kuna see sisaldas glütserooli ja seda ei saa kasutada fermenteerimise substraadina. Seetõttu oli tagatud,

et kõigil edasises eksperimentis kasutatavatel pämirakkudel oli säilinud mtDNA. Plasmidi pRS316±400 IRC3 kasutamine oli vajalik mtDNA säilitamise tagamiseks katse vastavasse etappi jõudmiseni.

Tüve konstrueerimist alustati pRS316±400 IRC3 plasmidi transformeerimisega eelpool nimetatud tüvesse. Selles plasmidis on IRC3 geen koos 400 ap väljapoole ulatuvate genoomsete järjestustega, mis toodab funktsionaalset valku, ning URA3 marker (joonis 14).



Joonis 14. IRC3 geeni sisaldava plasmidi asendamine IRC3 mutantset geeni sisaldava plasmiidiga. Tüvesse w303a *irc3*:Hph transformeeriti pRS316±400 IRC3 plasmidi ning külvati Sc –Ura söötmele, seejärel transformeeriti uuritavat IRC3 mutatsiooni sisaldav plasmiid ning katse edukuse kontrollimiseks vajalikud konstruktid, mis olid pRS315 plasmidi baasil. Pärast transformatsiooni kasvatati tüvesid –Ura-Leu söötmel. Mõlemat vektorit sisaldavad rakud külvati FOA -Leu söötmele. FOA -Leu söötmel suutsid kasvada ainult need rakud, mis sisaldasid LEU2 markeriga plasmidi.

Transformeeritud rakud plaaditi plasmidi sisaldavate rakkude selekteerimiseks SC-Ura tardsöötmele. Eelnevad katsed olid näidanud plasmidi pRS316±400 IRC3 sisaldavates rakkudes võimet kompenseerida kromosomaalse IRC3 geeni deletsiooni.

Pärast seda transformeeriti *S. cerevisiae* rakkudesse w303 *irc3:Hph* antud töö käigus valmistatud plasmid pRS315±400 IRC3 SAT mut.

Negatiivseks kontrolliks transformeeriti pRS315 plasmiid, positiivseks kontrolliks pRS315±400 IRC3 plasmidi ning lisakontrollina oli transformeeritud pRS315±400 IRC3 GKT mut plasmiid (eelnevalt Karin Villemsoni konstrueeritud) (joonis 12), mis sisaldas mutatsiooni I motiivis (K65A) ning ei olnud võimeline ATP'd lagundama (Biokeemia õppetool, publitseerimata andmed). Kuna eelnevalt transformeeritud pRS316±400 IRC3 plasmiid sisaldas URA3 markerit ja uuritav mutantset IRC3 järjestust sisaldav plasmiid ning kontrollplasmiidid sisaldasid LEU2 markerit, külvati transformeeritud rakud SC–Ura-Leu glükoosi sisaldavale söötmele. Sellistes tingimustes said kasvada vaid need rakud, mis sisaldasid mõlemat vektorit.

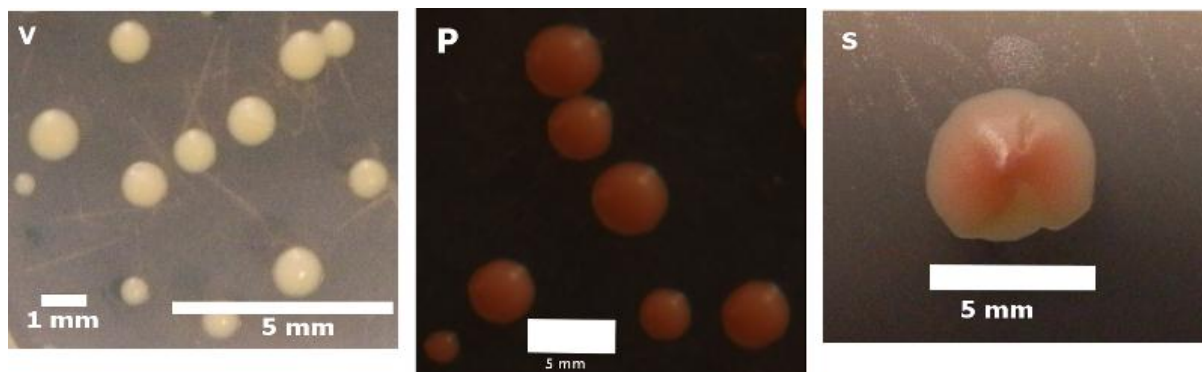
2.3.3. Funktsionaalset IRC3 geeni sisaldava plasmidi asendamine IRC3 SAT mut geeniga plasmidi vastu

Mutantse fenotüübi avaldumise uurimiseks, oli vajalik vabaneda pRS316 plasmiidist, kuna see sisaldas metsiktüüpi IRC3 geeni. Plasmiidist pRS316 oli võimalik vabaneda tänu sellele, et FOA'd sisaldavale söötmele külvatud rakud hülgevad plasmiidid, mis sisaldavad URA3 markergeeni.

SC-Ura-Leu söötmel kasvanud kolooniatest külvati rakke SC-Leu vedelsöötmele ning optimaalse OD₆₀₀ juures tehti vajalikud lahjendused ning külvati rakud edasi FOA–Leu söötmele. FOA-Leu söötmel suutsid kasvada vaid pRS316±400 IRC3 plasmidi kaotanud rakud. Järelikult ka metsiktüüpi IRC3 geeni pRS316 plasmidi baasil. Selektiivsel FOA-Leu tardsöötmel üles kasvanud rakud sisaldasid järgmisi plasmide: pRS315, pRS315400 IRC3, pRS315±400 IRC3 SAT mut ja pRS315±400 IRC3 GKT mut. Vektoris pRS315 oli LEU2 selektiivne marker.

Selliselt teostatud katse põhjal oli võimalik jälgida uuritava mutandi mõju mitokondriaalse genoomi säilimisele. Katsesüsteemi põhimõte seisnes selles, et ADE2 mutatsiooni tulemusel moodustasid funktsionaalse mtDNA-ga (ρ^+) rakud fermenteeritaval süsinikuallikal suuri punaseid *grande* kolooniaid. Samas need rakud, mille normaalne

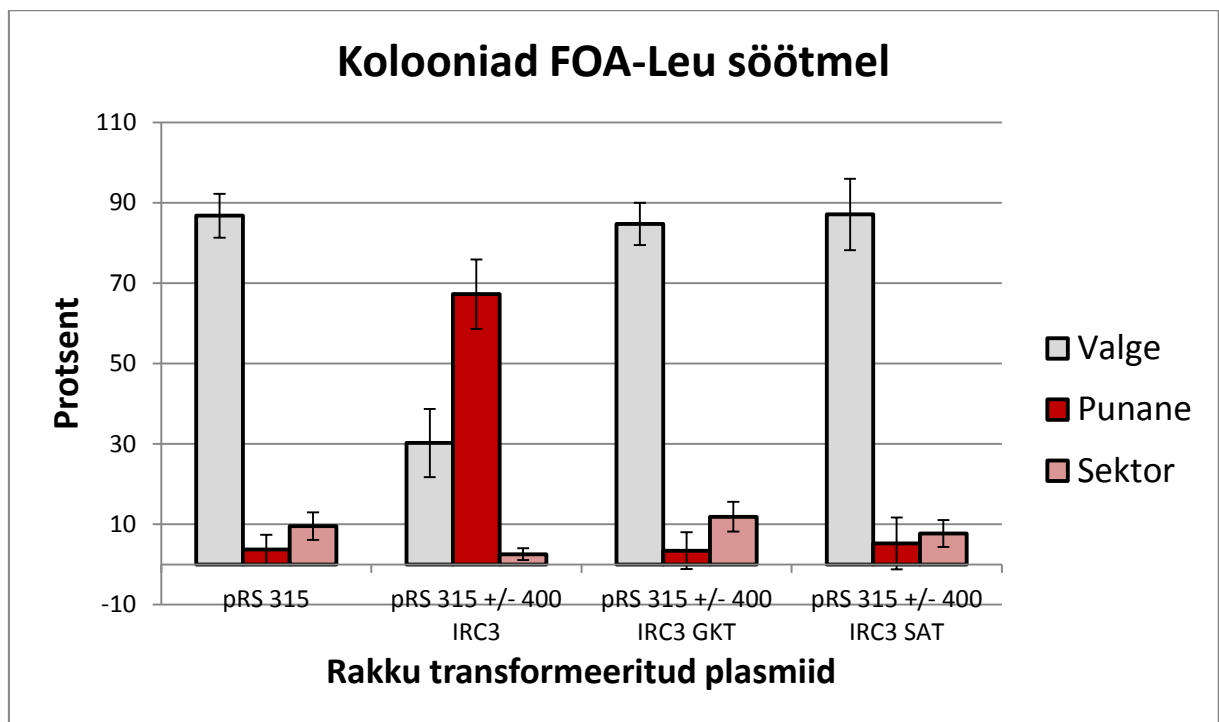
mitokondriaalne genoom oli ära kadunud, moodustasid valgeid *petite* kolooniaid. Rakud *petite* kolooniates võivad olla ρ^- (esineb suurte deletsioonidega mtDNA'd) või ρ^0 (täielikult kadunud mtDNA). Jagunemise käigus võivad moodustuda segatüüpi, punaste ja valgete sektoritega kolooniad. Nendes kolooniates on jagunemise käigus osal rakkudest kaduma läinud funktsionaalne mtDNA (ρ^+ genoom) (joonis 15).



Joonis 15. FOA-Leu söötmel kasvanud erineva fenotüübiga pärmikolooniad. V – valged kolooniad (ρ^-/ρ^0), P – punased kolooniad (ρ^+) ning S – sektoritega kolooniad ($\rho^+, \rho^-/\rho^0$).

Fermenteeritaval süsinikuallikal on võimalik mutantse fenotüübi avaldumist jälgida ka kvantitatiivselt – mida rohkem valgeid *petite* kolooniaid, seda tähtsama funktsionaalse defektiga on uuritav IRC3 geeni mutant.

FOA-Leu söötmel moodustunud erineva värvusega kolooniad loendati ning tehti statistiline analüüs (joonis 16 ja tabel 4, lisades tabel 5). Katse teostati 4 korduses. Erinevalt värvunud kolooniad loeti 1 nädala möödumisel.



Joonis 16. Erinevaid plasmide sisaldavad pärmikolooniad osakaal –LEU FOA söötmel. Punased tulbad tähistavad punaseid kolooniaid, valged tulbad valgeid kolooniaid ning roosad tulbad sektoritega kolooniaid, mis kasvamise käigus kaotavad funktsionaalse mtDNA. Joonis on koostatud lähtuvalt tabeli 5 andmetest.

Tabel 4. Kolooniad loendus FOA-Leu selektiivsöötmel					
Loenduse nr	Genotüüp	pRS 315	pRS 315 +/- 400 IRC3	pRS 315 +/- 400 IRC3 GKT	pRS 315 +/- 400 IRC3 SAT
1	Valge	462	57	244	108
	Punane	2	153	0	0
	Sektor	64	8	50	3
	Kokku	528	218	294	111
2	Valge	460	122	725	620
	Punane	39	472	94	118
	Sektor	45	10	110	79
	Kokku	544	604	929	817
3	Valge	436	168	568	683
	Punane	35	272	14	38
	Sektor	67	4	54	76
	Kokku	538	444	636	797
4	Valge	450	306	509	735
	Punane	4	496	8	14
	Sektor	25	33	58	73
	Kokku	479	835	575	822

* Andmete pikem analüüs lisa 1, tabel 5.

Negatiivse kontrollina kasutatud plasmid pRS315 sisaldavad rakud moodustasid kõige rohkem valgeid, veidi sektoritega kolooniaid ning mõne üksiku punase koloonia, sest nendes plasmiidides puudus funktsionaalne IRC3 geen ning seetõttu ei suutnud nad säilitada funktsionaalset mtDNA'd.

Positiivse kontrollina kasutatud pRS315±400 IRC3 plasmidi sisaldavaid rakke, milles oli täispikk IRC3 geen, moodustasid ligi 70 % ulatuses punaseid kolooniaid, mis tähendas, et IRC3 geeni koopia, koos selle promootor- ja terminaator aladega suutis kompenseerida genoomse koopia puudumist $\Delta irc3$ tüves.

Lisakontrollina kasutatud plasmidi pRS315±400 IRC3 GKT mut sisaldavate rakkude fenotüüp oli sarnane $\Delta irc3$ rakkudele, moodustades ligikaudu 85% valgeid kolooniaid, veidi üle 10% sektoritega kolooniaid ning ainult 3,4% punaseid kolooniaid. Sellest järeldub, et teostatud mutatsiooni tulemusel, Walkeri I motiivis, on Irc3 valk kaotanud ATPasse funktsiooni, mis on vajalik pärmi mitokondriaalse DNA stabiilsuse säilitamiseks (Andmed esitatud joonisel 16, Tabelis 4 ja lisades Tabelis 5). Antud tulemus oli kooskõlas sama konstruktiga eelnevalt läbi viidud katsete tulemustega (Biokeemia labor, publitseerimata andmed).

Samuti olid IRC3±400 SAT mut plasmidi sisaldavate rakkude fenotüüp sarnane $\Delta irc3$ pRS315 plasmidi sisaldavate rakkude fenotüübiga, kus funktsionaalne IRC3 geen puudus täielikult. Valgete kolooniate suhe ulatus ligi 90%'ni, sektoritega kolooniaid moodustus 7,7% ning punaseid kolooniaid 5,2%.

Saadud tulemus näitas, et Irc3 valgu III (SAT) helikaasne motiiv on vajalik valgu funktsioneerimiseks *in vivo*. Märkimisväärne on see asjaolu, et III motiivi mutatsioon põhjustas samasuguse tugeva fenotüübilise efekti nagu I motiivi (pRS315±400 IRC3 GKT mut) muteerimine. Motiivi I funktsioonalsuse kadumine põhjustab ATP lagundamise võime kadumist ning näitab, ATPasse aktiivsuse vajadust Irc3 valgu funktsioneerimiseks ja selle mtDNA säilitamiseks *in vivo*. Samas III motiivi mutatsiooni tulemusel saadud samalaadne fenotüüp viitab sellele, et Irc3'le oma funktsiooni täitmiseks ning mtDNA säilitamiseks *in vivo* on vaja kas siduda ja/või lahti keerata nukleiinhapet (DNA'd, RNA'd või DNA:RNA dupleksi).

Katse tulemustest võib järeldada, et DExD/H-box perekonna valgu Irc3 konserveerunud helikaasne motiivid omavad tähtsat rolli mtDNA säilimises. Seejures on

IRC3 geeni III helikaasse motiivi esinemine, muutmata kujul (SAT), oluline rakkude funktsionaalsuse tagamises.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö käigus konstrueeriti pRS315±400 IRC3 SAT mut plasmiid, mis kodeeris Irc3 valgu amihappelises järjestuses asendusi S190A ja T192A positsioonides. Sellise mutatsiooni tulemusel muutus III helikaasne konserveerunud SAT motiiv AAA motiiviks ning kaotas nukleiinhapete seondumis- ja/või lahtikeerdumisvõime.

Saadud plasmiid koos teiste, LEU selektiivmarkerit sisaldavate, plasmiididega (pRS315, pRS315±400 IRC3 ja pRS315±400 IRC3 GKT mut) viidi *S. cerevisiae* Δ irc3 tüvesse, kuhu oli eelnevalt transformeeritud, URA selektiivmarkerit sisaldavad, pRS316±400 IRC3 plasmiid. Plasmiid pRS316±400 IRC3 tagas metsiktüüpi mtDNA säilitamist kuni viimase katse etapini, kus eemaldati rakkudest 5-FOA mõjul.

Alles jäänud plasmide (pRS315, pRS315±400 IRC3, pRS315±400 IRC3 GKT mut ja pRS315±400 IRC3 SAT mut) sisaldavate rakkude fenotüüpide põhjal oli võimalik hinnata vastavate mutatsioonide mõju mtDNA säilitamisele.

Katsed põhinesid sellel, et Δ irc3 rakud ei suuda fermenteeritaval süsinikuallikal oma mitokondriaalset genoomi säilitada, seetõttu avaldub rakkudes alles jäänud plasmiidide mõju mtDNA'le. Mõju saab hinnata kvantitatiiselt, lähtuvalt 5FOA –Leu söötmel kasvanud kolooniate värvusest.

Kolooniad, mis sisaldasid negatiivse kontrollina pRS315 plasmidi kasutatud plasmiid pRS315 sisaldavad rakud ei olnud võimelised metsiktüüpi mtDNA säilitama ning moodustasid suures enamuses valgeid kolooniaid.

Positiivse kontrollina kasutatud pRS315±400 IRC3 plasmidi sisaldavad rakud säilitasid metsiktüüpi mtDNA'd ning moodustasid suures enamuses punaseid kolooniaid.

Lisakontrollina kasutatud plasmidi pRS315±400 IRC3 GKT mut sisaldavate rakkude fenotüüp oli sarnane pRS315 sisaldavatele Δ irc3 rakkudele. Antud tulemus oli kooskõlas sama konstruktiga eelnevalt läbi viidud katsete tulemustega (Biokeemia labor, publitseerimata andmed).

Ka IRC3±400 SAT mut plasmidi sisaldavate rakkude fenotüüp sarnanes Δ irc3 pRS315 plasmidi sisaldavate rakkude fenotüübiga.

Saadud tulemus näitas, et Irc3 valgu III (SAT) helikaasne motiiv on vajalik valgu funktsioneerimiseks *in vivo*, samuti viitab see Irc3'e vajadusele siduda ja/või lahti keerata nukleiinhapet (DNA'd, RNA'd või DNA:RNA dupleksit) ning seeläbi säilitada mtDNA'd.

The effect of III helicase motif mutation of DExD/H-box Irc3 protein on *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial DNA stability

For respiration yeast cells need functional mitochondrial genome. Although mitochondria have their own independent genome, about 99 percent of mitochondrial proteins are encoded by the nuclear genome and are transported into mitochondria. Many of these proteins are responsive for the maintenance and integrity of the mitochondrial genome.

One of them is novel putative helicase which is encoded by IRC3 gene. This protein contains conserved helicase motifs and belongs to DExD/H subfamily of helicase Superfamily II.

Each conserved helicase motif has its own function. Conserved helicase motif III (SAT) is reported to be responsible for coupling ATPase and nucleic acid binding or helicase activities and mutations in this motif should abolish DNA binding and helicase activities in DExD/H box proteins.

To determine how the mutation of the III conserved helicase motif (SAT) affects the integrity of mtDNA, a strain with a mutation in that region was constructed.

The results of this study demonstrate that strains which had a mutation in the III motif were deficient in respiratory activity. This finding suggests that the motif III of the Irc3 protein is essential for protein function *in vivo* and its function on mtDNA maintenance. Although this result leads to a suggestion that ability to bind and/or unwind nucleic acid by Irc3 is needed for its proper function in mitochondria.

Al Ghouleh, I., Khoo, N.K.H., Knaus, U.G., Griendling, K.K., Touyz, R.M., Thannickal, V.J., Brachowsky, A., Nauseef, W.M., Kelley, E.E., Bauer, P.M., Darley-USmar, V., Shiva, S., Cifuentes-Pagano, E., Freeman, B.A., Galdwin, M.T., Pagano, P.J., (2011). Oxidases and Peroxidases in Cardiovascular and Lung Disease: New Concepts in Reactive Oxygen Species Signaling. *Free Radic Biol Med.* 51(7): 1271–1288.

Alvaro, D., Lisby, M., Rothstein, R., (2007). Genome-wide analysis of Rad52 foci reveals diverse mechanisms impacting recombination. *PLoS Genet*; 3(12):e228.

Banroques, J., Doère, M., Dreyfus, M., Linder, P., Tanner, K., (2010). Motif III in Superfamily 2 “Helicases” Helps Convert the Binding Energy of ATP into a High-Affinity RNA Binding Site in the Yeast DEAD-Box Protein Ded1. *J. Mol. Biol.* 396:949-966.

Bauer, C., Herzog, V., Bauer, M.F., (2001). Improved Technique for Electron Microscope Visualization of Yeast Membrane Structure. *Microscopy and Microanalysis* 7: 530-534

Becker, T., Gebert, M., Pfanner, N., van der Laan, M., (2009). Biogenesis of mitochondrial membrane proteins. *Curr Opin Cell Biol* 21: 484-493

Blum, S., Schmid, S.R., Pause, A., Buser, P., Linder, P., Sonenberg, N. ja Trachsel, H., (1992). ATP hydrolysis by initiation factor 4A is required for translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae* . *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89: 7664–7668.

Caruthers, J.M., McKay, D.B., (2002). Helicase structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol*; 12(1):123-33

Chen, X.J., Butow, R.A., (2005). The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat Rev Genet* 6: 815-825

Chen, X.J., Guan, M.X., Clark-Walker, G.D., (1993). MGM101, a nuclear gene involved in maintenance of the mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 21: 3473-3477

Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N.K., Linder, P., (2006). The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene*; 367: 17-37

- Daugeron, M.C., Linder, P. (2001). Characterization and mutational analysis of yeast Dbp8p, a putative RNA helicase involved in ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res.* 29: 1144 – 1155.
- de la Cruz, J., Kressler, D., Linder, P., (1999). Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem. Sci.* 24:192–198.
- Del Campo, M., Lambowitz, A.M., (2009). Structure of the yeast DEAD box protein Mss116p reveals two wedges that crimp RNA. *Mol. Cell*, 35:598–609
- de Zamaroczy, M., Bernardi, G., (1986). The primary structure of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*--a review. *Gene* 47, 155-177
- Diffley, J.F., Stillman, B., (1991). A close relative of the nuclear, chromosomal high-mobility group protein HMGI in yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7864-7868
- Diffley, J.F., Stillman, B., (1992). DNA binding properties of an HMGI-related protein from yeast mitochondria. *J Biol Chem* 267: 3368-3374
- Dittrich, M., Schulten, K., (2005). Zooming in on ATP hydrolysis in F1. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 37: 441–444
- Donahue, S.L., Corner, B.E., Bordone, L., Campbell, C., (2001). Mitochondrial DNA ligase function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 29: 1582-1589
- Dziembowski, A., Piwowarski, J., Hoser, R., Minczuk, M., Dmochowska, A., Siep, M., van der Spek, H., Grivell, L., Stepien, P.P., (2003). The yeast mitochondrial degradosome. Its composition, interplay between RNA helicase and RNase activities and the role in mitochondrial RNA metabolism. *J Biol Chem*: 278(3):1603-11
- Edwards-Gilbert, G., Kim, D.H., Kim, S.H., Tseng, Y.H., Yu, Y., Lin, R.J., (2000). Dominant negative mutants of the yeast splicing factor Prp2 map to a putative cleft region in the helicase domain of DExD/H-box proteins. *RNA*. 6:1106–1119.
- Ephrussi, B., Slonimski, P.P., (1955). Subcellular units involved in the synthesis of respiratory enzymes in yeast. *Nature* 176 1207–1208
- Fairman-Williams, M.E., Guenther, U.P., Jankowsky, E., (2010). SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr Opin Struct Biol*; 20(3): 313–324.

- Foury, F., (1989). Cloning and sequencing of the nuclear gene MIP1 encoding the catalytic subunit of the yeast mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem* 264: 20552-20560
- Foury, F., Lahaye, A., (1987). Cloning and sequencing of the PIF gene involved in repair and recombination of yeast mitochondrial DNA. *Embo J* 6: 1441-1449
- Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S., Lazarow, P.B., (1982). Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 93: 97-102
- Fuller-Pace, F.V., (2006). DExD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res* 34: 4206-4215
- Gershon, H., Gershon, D., (2000). The budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a model for aging research: a critical review. *Mech Ageing Dev* 120: 1-22
- Gietz, R. D., Woods, R. A., (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350, 87
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G., (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274: 546, 563-7.
- Greenleaf, A.L., Kelly, J.L., Lehman, I.R., (1986). Yeast RPO41 gene product is required for transcription and maintenance of the mitochondrial genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 3391-3394
- Gross, C.H. ja Shuman, S., (1998). The nucleoside triphosphate and helicase activities of vaccinia virus NPH-II are essential for virus replication. *J. Virol.*, 72: 4729–4736.
- Hall, M.C., Matson, S.W., (1999). Helicase motifs: the engine that powers DNA unwinding. *Mol Microbiol* 34: 867-877
- Hales, K.G., (2010). Mitochondrial Fusion and Division. *Nature Education* 3(9):12
- Halls, C., Mohr, S., Del Campo, M., Yang, Q., Jankowsky, E., Lambowitz, A.M., (2007). Involvement of DEAD-box proteins in group I and group II intron splicing. Biochemical characterization of Mss116p, ATP hydrolysis-dependent and -independent mechanisms, and general RNA chaperone activity. *J Mol Biol*: 19;365(3):835-55

- Hanahan, D., (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 43 166: 557-580
- Heilek, G.M., Peterson, M.G., (1997). A point mutation abolishes the helicase but not the nucleoside triphosphatase activity of hepatitis C virus NS3 protein. *J. Virol.* 71: 6264–6266.
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., O'Shea, E.K., (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast, *Nature* 425:686–691.
- Iost, I., Dreyfus, M., Linder, P., (1999). Ded1p, a DEAD-box protein required for translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*, is an RNA helicase. *J. Biol. Chem.* , 274: 17677–17683.
- Jankowsky, E., Bowers, H., (2006). Remodeling of ribonucleoprotein complexes with DExH/D RNA helicases. *Nucleic Acids Res*, 34:4181-4188.
- Jankowsky, E., Fairman, M., (2007). RNA helicases — one fold for many functions. *Curr Opin Struct Biol*: 17:316-324
- Kaufman, B.A., Newman, S.M., Hallberg, R.L., Slaughter, C.A., Perlman, P.S., Butow, R.A., (2000). In organello formaldehyde crosslinking of proteins to mtDNA: identification of bifunctional proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7772-7777
- Kelly, J.L., Lehman, I.R., (1986). Yeast mitochondrial RNA polymerase. Purification and properties of the catalytic subunit. *J Biol Chem* 261: 10340-10347
- Kleff, S., Kemper, B., Sternglanz, R., (1992). Identification and characterization of yeast mutants and the gene for a cruciform cutting endonuclease. *Embo J* 11: 699-704
- Kuusk, S., Sedman, T., Joers, P., Sedman, J., (2005). Hmi1p from *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria is a structure-specific DNA helicase. *J Biol Chem* 280: 24322-24329
- Lahaye, A., Stahl, H., Thines-Sempoux, D., Foury, F., (1991). PIF1: a DNA helicase in yeast mitochondria. *Embo J* 10: 997-1007
- Lee, C.M., Sedman, J., Neupert, W., Stuart, R.A., (1999). The DNA helicase, Hmi1p, is transported into mitochondria by a C-terminal cleavable targeting signal. *J Biol Chem* 274: 20937-20942
- Lill, R., Kispal, G., (2000). Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci*: 25(8):352-6.

- Lin, C., Kim, J.L., (1999). Structure-based mutagenesis study of hepatitis C virus NS3 helicase. *J. Virol.* 73, 8798-8807
- Linder, P., (2006). Dead-box proteins: a family affair—active and passive players in RNP-remodeling, *Nucleic Acids Res.* 34:4168–4180.
- Linder, P., Owtrim, G.W., (2009). Plant RNA helicases: linking aberrant and silencing RNA. *Trends Plant Sci.* 14:344-352
- Linder, P., Jankowsky, E., (2011). From unwinding to clamping—the DEAD box RNA helicase family. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 505–516
- Ling, F., Makishima, F., Morishima, N., Shibata, T., (1995). A nuclear mutation defective in mitochondrial recombination in yeast. *Embo J* 14: 4090-4101
- Ling, F., Shibata, T., (2002). Recombination-dependent mtDNA partitioning: in vivo role of Mhr1p to promote pairing of homologous DNA. *Embo J* 21: 4730-4740
- Lipinski, K.A., Kaniak-Golik, A., Golik, P., (2010). Maintenance and expression of the *S. cerevisiae* mitochondrial genome—From genetics to evolution and systems biology. *Bochim Biophys Acta* 1797(6-7):1086-98
- Lockshon, D., Zweifel, S.G., Freeman-Cook, L.L., Lorimer, H.E., Brewer, B.J., Fangman, W.L., (1995). A role for recombination junctions in the segregation of mitochondrial DNA in yeast. *Cell* 81: 947-955
- Lohman, T.M., Bjornson, K.P., (1996). Mechanisms of helicase-catalysed DNA unwinding. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 169-214
- Lohman, T.M., Tomko, E.J., Wu, C.G., (2008). Non-hexameric DNA helicases and translocases: mechanisms and regulation. *Nat Rev Cell Biol*: 9:391-401
- Mangus, D.A., Jang, S.H., Jaehning, J.A., (1994). Release of the yeast mitochondrial RNA polymerase specificity factor from transcription complexes. *J Biol Chem* 269: 26568-26574
- Marians, K., (2000). Crawling and wiggling on DNA: structural insights to the mechanism of DNA unwinding by helicases. *Structure Fold Des.* 8, R227-235
- Matson, S.W., George, J.W., and Bean, D.W., (1994) DNA helicases: enzymes with essential roles in all aspects of DNA metabolism. *Bioessays* 16: 13-22

- Mayas, R.M., Staley, J.P., (2006). DEAD on. *Nat Struct Mol Biol*, 13:954-955
- McBride, H.M., Neuspiel, M., Wasiak, S., (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol* 16: R551-560
- Meeusen, S., Tieu, Q., Wong, E., Weiss, E., Schieltz, D., Yates, J.R., Nunnari, J., (1999). Mgm101p is a novel component of the mitochondrial nucleoid that binds DNA and is required for the repair of oxidatively damaged mitochondrial DNA. *J Cell Biol* 145: 291-304
- Merz, S., Westermann, B., (2009). Genome-wide deletion mutant analysis reveals genes required for respiratory growth, mitochondrial genome maintenance and mitochondrial protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol* 10: R95.
- Miyakawa, I., Sando, N., Kawano, S., Nakamura, S., Kuroiwa, T., (1987). Isolation of morphologically intact mitochondrial nucleoids from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 88 (Pt 4): 431-439
- Newmeyer, D.D., Ferguson-Miller, S., (2003). Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*: 112(4):481-90
- Nielsen, K.H., Chamieh, H., Andersen, C.B., Fredslund, F., Hamborg, K., Le Hir, H., Andersen, G.R., (2009). Mechanism of ATP turnover inhibition in the EJC. *RNA*, 15: 67–75
- Pause, A., Sonenberg, N., (1992). Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *Embo J* 11: 2643-2654
- Pause, A., Méthot, N., Sonenberg, N., (1993). The HRIGRXXR region of the DEAD box RNA helicase eukaryotic translation initiation factor 4A is required for RNA binding and ATP hydrolysis. *Mol. Cell. Biol.* , 13: 6789–6798.
- Petranovic, D., Tyo, K., Vemuri, G.N., Nielsen, J., (2010). Prospects of yeast systems biology for human health: integrating lipid, protein and energy metabolism. *FEMS Yeast Res* 10: 1046-1059
- Rocak, S., Linder, P., (2004). DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:232–241.
- Ropp, P.A., Copeland, W.C., (1995). Characterization of a new DNA polymerase from *Schizosaccharomyces pombe*: a probable homologue of the *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase gamma. *Gene* 165: 103-107

- Rose, F., Winston, P.H., (1990). Methods in yeast genetics, a laboratory course Annal. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sarkar, G., Sommer, S.S., (1990). The "megaprimer" Method of Site-Directed Mutagenesis. *Biotechniques* 8(4): 404-7
- Schinkel, A.H., Koerkamp, M.J., Touw, E.P., Tabak, H.F., (1987). Specificity factor of yeast mitochondrial RNA polymerase. Purification and interaction with core RNA polymerase. *J Biol Chem* 262: 12785-12791
- Schmid, S.R., Linder, P., (1991). Translation initiation factor 4A from *Saccharomyces cerevisiae* : analysis of residues conserved in the D-E-A-D family of RNA helicases. *Mol. Cell. Biol.*, 11: 3463–3471.
- Schmid, S.R., Linder, P., (1992) D-E-A-D protein family of putative RNA helicases. *Mol Microbiol* 6: 283-292
- Schmidt, U., Lehmann, K., Stahl, U., (2002). A novel mitochondrial DEAD box protein (Mrh4) required for maintenance of mtDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*;2(3):267-76
- Sedman, T., Joers, P., Kuusk, S., Sedman, J., (2005). Helicase Hmi1 stimulates the synthesis of concatemeric mitochondrial DNA molecules in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 47: 213-222
- Sedman, T., Kuusk, S., Kivi, S., Sedman, J., (2000). A DNA helicase required for maintenance of the functional mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 20: 1816-1824
- Sherman, F., (2002). Getting started with yeast. *Methods Enzymol* 350: 3-41
- Shiiba, D., Fumoto, S. I., Miyakawa, I., Sando, N., (1997). Isolation of giant mitochondrial nucleoids from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Protoplasma* 198, 177–185.
- Schneider, S., Hotz, H.R., Schwer, B. (2002). Characterization of dominant-negative mutants of the DEAH-box splicing factors Prp22 and Prp16. *J. Biol. Chem.* 277: 15452–15458.
- Singleton, M.R., Dillingham, M.S., Wigley, D.B., (2007). Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu Rev Biochem.* 76:23-50

- Sikorski, R.S., Hieter, P., (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122: 19-27
- Smeitink, J., van den Heuvel, L., DiMauro, S., (2001). The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat Rev Genet* 5:342-52.
- Soultanas, P., Wigley, D.B., (2000). DNA helicases: “inching forcessing function of the yeast U14 small nucleolar RNA can be res- ward.” *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 124–128.
- Soultanas, P., Wigley, D.B., (2001). Unwinding the “Gordian knot” of helicase action. *Trends Biochem. Sci.* 26, 47–54.
- Szczesny, R.J., Wojcik, M.A., Borowski, L.S., Szewczyk, M.J., Skorok, M.M., Golik, P., Stepień, P.P., (2013). Yeast and human mitochondrial helicases. *Biochim Biophys Acta*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagrm.2013.02.009>
- Story, R.M., Li, H., Abelson, J.N., (2001). Crystal structure of a DEAD box protein from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 98: 1465–1470
- Strunk, B.S., Karbstein, K., (2009). Powering through ribosome assembly. *RNA* 15:2083-2104
- Zelenaya-Troitskaya, O., Perlman, P.S., Butow, R.A., (1995). An enzyme in yeast mitochondria that catalyzes a step in branched-chain amino acid biosynthesis also functions in mitochondrial DNA stability. *Embo J* 14: 3268-3276
- Zweifel, S.G., Fangman, W.L., (1991). A nuclear mutation reversing a biased transmission of yeast mitochondrial DNA. *Genetics* 128: 241-249
- Tanner, N.K., Linder, P., (2001). DExD/H Box RNA Helicases: From Generic Motors to Specific Dissociation Functions. *Mol. Cell*: 8: 251–262
- Tanner, N.K., (2003). The newly identified Q motif of DEAD box helicases is involved in adenine recognition. *Cell Cycle*.; 2(1) :18-9
- Tzagoloff, A., Myers, A.M., (1986). Genetics of mitochondrial biogenesis. *Annu Rev Biochem* 55:249-85
- Tuteja, N., Tuteja, R., (2004). Unraveling DNA helicases Motif, structure, mechanism and function. *Eur. J. Biochem.* 271, 1849-1863.

Van Dyck, E., Foury, F., Stillman, B., Brill, S.J., (1992). A single-stranded DNA binding protein required for mitochondrial DNA replication in *S. cerevisiae* is homologous to *E. coli* SSB. *Embo J* 11: 3421-3430

van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W., (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 112-124

Visser, W., van Spronsen, E.A., Nanninga, N., Pronk, J.T., Gijs Kuenen, J., van Dijken, J.P., (1995). Effects of growth conditions on mitochondrial morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 67(3):243-53

Westermann, B., (2002). Merging mitochondria matters: cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion. *EMBO Rep*: 3(6):527-31

Willer, M., Rainey, M., Pullen, T., Stirling, C.J., (1999). The yeast CDC9 gene encodes both a nuclear and a mitochondrial form of DNA ligase I. *Curr Biol* 9: 1085-1094

Williamson, D., (2002). The curious history of yeast mitochondrial DNA. *Nat Rev Genet* 3: 475-481

LISAD

LISA 1

Tabel 5. Kolooniate loendus ja arvutuskäik FOA-Leu selektiivsöötme tassidel.					
Loenduse nr	Genotüüp	pRS 315	pRS 315 +/- 400 IRC3	pRS 315 +/- 400 IRC3 GKT	pRS 315 +/- 400 IRC3 SAT
1	Valge	462	57	244	108
	Punane	2	153	0	0
	Sektor	64	8	50	3
	Kokku	528	218	294	111
2	Valge	460	122	725	620
	Punane	39	472	94	118
	Sektor	45	10	110	79
	Kokku	544	604	929	817
3	Valge	436	168	568	683
	Punane	35	272	14	38
	Sektor	67	4	54	76
	Kokku	538	444	636	797
4	Valge	450	306	509	735
	Punane	4	496	8	14
	Sektor	25	33	58	73
	Kokku	479	835	575	822
Suhe protsentides					
1	Valge	87,5	26,1	83,0	97,3
	Punane	0,4	70,2	0,0	0,0
	Sektor	12,1	3,7	17,0	2,7
2	Valge	84,6	20,2	78,0	75,9
	Punane	7,2	78,1	10,1	14,4
	Sektor	8,3	1,7	11,8	9,7
3	Valge	81,0	37,8	89,3	85,7
	Punane	6,5	61,3	2,2	4,8
	Sektor	12,5	0,9	8,5	9,5
4	Valge	93,9	36,6	88,5	89,4
	Punane	0,8	59,4	1,4	1,7
	Sektor	5,2	4,0	10,1	8,9
Protsentide keskmine					
Valge		86,8	30,2	84,7	87,1
Punane		3,7	67,2	3,4	5,2
Sektor		9,5	2,5	11,9	7,7
Standardhälve					

Valge	5,47	8,49	5,26	8,89
Punane	3,61	8,66	4,55	6,45
Sektor	3,44	1,50	3,70	3,35

* Tabeli andmete arvutuskäik: kolooniad loendati ning arvutati suhted protsentides. Seejärel arvutati kolme teostatud katse keskväärtused ning standardhälve.

Lihtlitsents

Lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Ants Tamme (sünnikuupäev: 18. mai 1988),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

DExD/H-box valgu Irc3 kolmanda helikaasse motiivi muteerimise mõju *Saccharomyces cerevisiae* mitokondriaalse DNA stabiilsusele,

mille juhendaja on MSc Ilja Gaidutšik,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2013